



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**José Amaro de Oliveira
Frutuoso**

**Estudo de HER2 em
carcinomas da mama**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

José Amaro de Oliveira Frutuoso

Universidade de Aveiro

2010

Departamento de Biologia

Estudo de HER2 em carcinomas da mama

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, Professora Adjunta da Área Científica de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto e da Prof. Doutora Maria de Lourdes Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

À minha família, lembrando a Ana Maria.

O júri

Presidente

Helena Silva, Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Vogais

Regina Augusta Silva, Professora Adjunta, Coordenadora da Área e Curso de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, (orientadora)

Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora Associada com Agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, (co-orientadora)

Ana Paula Soares Dias Ferreira, Professora Associada, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e IPATIMUP, (arguente)

Agradecimentos

À Professora Regina Augusta Silva pelo apoio, dedicação, confiança e paciência demonstradas.

À professora Ana Paula Soares por ter aceite a tarefa de arguente neste trabalho e pelo tempo, do pouco que dispõe, disponibilizado. Foi para mim uma honra este nosso reencontro profissional.

À Dr^a Mrinalini Honavar pelo entusiasmo demonstrado e permissão na realização dos testes no Serviço que dirige.

Aos meus colegas de trabalho do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Pedro Hispano pelo apoio e interesse.

Ao amigo e colega José Ruivo pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade na avaliação dos casos de SISH.

A todos o meu obrigado e bem-haja.

Palavras-chave HER2, hibridação *in situ*, carcinoma da mama.

Resumo

O receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano (HER2 - Human Epidermal growth factor Receptor-type 2) é um importante marcador tumoral na caracterização do cancro da mama, contudo existe controvérsia relativamente ao modo como se avalia o seu estado.

A primeira avaliação é efectuada por método imunocitoquímico, determinando a sobre-expressão da proteína HER2. Os casos equívocos requerem estudo molecular por hibridação *in situ*, determinando o estado do gene HER2.

O presente estudo avalia a concordância entre a amplificação do gene HER2 em casos de neoplasia maligna invasiva da mama determinada por hibridação *in situ* por fluorescência (fluorescence *in situ* hybridization - FISH) e pela técnica de hibridação *in situ* pela prata (silver enhanced *in situ* hybridization - SISH).

Foram analisados 69 casos por SISH (INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Ventana, Tucson), em que foi realizado o estudo por FISH em laboratório externo.

Todas as amostras foram coradas por imunohistoquímica (PATHWAY HER2/neu (4B5, Ventana).

A avaliação foi efectuada por dois observadores segundo os critérios definidos pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica/ Colégio Americano de Patologistas (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists ASCO/CAP).

Foi calculada a concordância e estimado o valor p pelo teste de McNemar para um nível de significância de 0,05. A concordância entre FISH e SISH foi de 94,74% ($p=0,250$, IC 95%).

As discrepâncias encontradas basearam-se na heterogeneidade intratumoral de alguns casos.

Em conclusão, o estudo do gene HER2, pode ser determinado por SISH de forma segura.

Como a metodologia SISH efectuada na plataforma Ventana combina o microscópio de campo claro, a análise molecular e é completamente automatizada, é susceptível de ser aplicada na rotina laboratorial em Anatomia Patológica, nomeadamente no Hospital Pedro Hispano.

Keywords

HER2, in situ hybridisation, breast carcinoma.

Abstract

Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 (HER2) is an important tumor marker in breast cancer. However, there is controversy regarding which method reliably measures HER2 status.

The first evaluation is carried out by immunohistochemistry, determining the expression of protein HER2. The equivocal cases require molecular study for in situ hybridization, determining the HER2 gene status.

This study evaluates the concordance between HER2 gene amplification in situ invasive breast cancer determined by fluorescence in situ hybridization (FISH) and a silver enhanced in-situ hybridization (SISH) technique.

Sixty nine cases were analyzed by bright field automated SISH (INFORM®, Ventana) and compared with direct-labeled manual FISH performed another laboratory.

All specimens were stained by immunohistochemistry (PATHWAY HER2/neu, (4B5, Ventana). Evaluation was performed by three observations following the algorithms of the manufacturers and the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) guidelines.

Concordance was calculated and the value of p of McNemar estimated. Overall concordance between FISH and SISH was 94,74% (p=0.250, 95%CI). Discrepancies were mostly seen in tumors with intra-tumor heterogeneity. In conclusion, HER2 gene copy status can be reliably determined by SISH.

There was a low inter-observer variability in the interpretation of SISH, suggesting that SISH is equally reliable in determining HER2 amplification as FISH. Because SISH combines bright field microscopy with molecular analysis and full automation, it appears to be particularly suited for routine application in surgical pathology, as in Hospital Pedro Hispano.

INDICE

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
1 Introdução	1
1.1 Carcinoma da mama	1
1.1.1 Epidemiologia	1
1.1.2 Factores de risco	2
1.2 Diagnóstico histopatológico e grau histológico	4
1.3 Estadiamento e Indicadores de Prognóstico	6
1.4 O gene HER2	8
1.4.1 Caracterização do gene HER2	8
1.4.2 Papel do HER2 no desenvolvimento do cancro da mama	8
1.4.3 HER2 como biomarcador preditivo de terapia	9
1.4.4 Métodos para avaliação de sobre-expressão e/ou amplificação de HER2	9
1.4.4.1 Imunohistoquímica	10
1.4.4.2 Hibridação <i>in situ</i> (HIS)	10
1.4.4.2.1 Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization (FISH)	10
1.4.4.2.2 Chromogenic <i>in situ</i> hybridization (CISH)	11
1.4.4.2.3 Silver enhanced <i>in situ</i> Hybridization (SISH)	11
1.5 Tratamento	12
2 Objectivos do trabalho	15
3 Material e métodos	17
3.1 População em estudo	17
3.2 Amostras	17
3.3 Avaliação da expressão do RE, RP e HER2	17
3.4 Avaliação do estado do gene HER2	18
3.5 Avaliação Microscópica	20
3.5.1 Avaliação dos RE, RP e HER2	20
3.5.2 Avaliação do estado do gene HER2	21
3.6 Análise estatística	22
4 Resultados	25
4.1 Caracterização da população	25
4.2 Avaliação da expressão dos RE e RP	26
4.3 Avaliação da expressão da proteína HER2	28
4.4 Avaliação do estado do gene HER2	30
5 Discussão	35
6 Conclusão e perspectivas futuras	41
Referências	43
Anexos	47

Lista de abreviaturas:

AND	Ácido Deoxirribonucleíco
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CAP	College of American Pathologists
CDIS	Carcinoma Ductal <i>in situ</i>
CEN17	Centrómero do cromossoma 17
CISH	Chromogenic In Situ Hybridization
CR17	Cromossoma 17
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP	Dinitrofenol
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drugs Administration
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization
HE	Hematoxilina Eosina
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
HIS	Hibridação <i>in situ</i>
HRP	Horseradish peroxidase
IHQ	Imunohistoquímica
QT	Quimioterapia
mAb	Anticorpo monoclonal
RE	Receptores de Estrogénio
RP	Receptores de Progesterona
SISH	Silver Enhanced <i>in situ</i> Hybridization
VIAS	Ventana Image Analysis System

Lista de figuras:

Figura 1. Taxa de incidência e de mortalidade por cancro (A) e por cancro mamário na mulher (B) a nível global. Adaptado da International Agency for Research on Cancer¹.

Figura 2. Taxa de incidência de cancro (A) e mortalidade por cancro (B) na mulher, em Portugal em 2008. Adaptado da International Agency for Research on Cancer¹.

Figura 3. Esquema explicativo da actividade do gene de um receptor tirosina cinase (Fonte: http://www. Roche.pt/sitestematicos/her2/index.cfm/her2_e_o_cancro/o-que-e-o-her2/)

Figura 4. Imuno-expressão dos receptores de estrogénio (A) e dos receptores de progesterona (B) em cancro mamário fixado em formol a 10% tamponado.

Figura 5. Representação gráfica dos casos em estudo relativamente à expressão RE e RP.

Figura 6. Corte de tecido mamário com neoplasia invasiva com imuno-expressão de HER2 em área de tumor invasivo.

Figura 7. Resultados de IHQ para avaliação da expressão de HER2 e receptores hormonais em tecido mamário.

Figura 8. Resultados de SISH para avaliação do estado de amplificação do gene HER2 em tecido mamário.

Figura 9. Distribuição dos casos avaliados para a imuno-expressão da HER2 segundo o estado de amplificação do gene HER2 pelo método SISH (A) e pelo FISH (B).

Figura 10. Distribuição dos casos segundo o benefício no tratamento por aplicação de terapia adjuvante.

Lista de tabelas:

Tabela 1. Principais factores de risco para o desenvolvimento do cancro da mama. Adaptado de Dixon, 2006⁴

Tabela 2. Classificação dos tumores da mama segundo a Organização Mundial de Saúde. (Adaptado de The World Health Organization Histologic Typing of Breast Tumors, 2nd ed.:Am. J. Clin. Pathol. 78:806, 1982)

Tabela 3. Classificação do Grau Microscópico do Carcinoma da Mama segundo o Sistema de Nottingham. Adaptado de Rosai, 2004 (Rosai and Ackerman's Surgical Pathology; J Rosai; 2004; 2nd)

Tabela 4. Atribuição de pontuação pelo Índice Mitótico contado de acordo com a área do campo, usando vários modelos de microscópios. Adaptado de Rosai, 2004 (Rosai and Ackerman's Surgical Pathology; J Rosai; 2004; 2nd)

Tabela 5. Caracterização do Estadiamento TNM, segundo as recomendações AJCC. (Adaptado de Cancer Staging Handbook, AJCC, 7th edition, Springer, 2010)

Tabela 6. Registo do clone dos anticorpos monoclonais usados, diluição e tempos de incubação e de recuperação antigénica.

Tabela 7. Critérios de classificação da avaliação dos resultados de IHQ para a HER2.

Tabela 8. Características clínico-patológicas da população em estudo (N=69).

Tabela 9. Caracterização histopatológica da população de pacientes em estudo (N=69).

Tabela 10. Distribuição dos casos segundo a percentagem de células com imuno-expressão encontrada para os receptores de estrogénio (RE) e para os receptores de progesterona (RP).

Tabela 11. Frequências absolutas e relativas quanto à imuno-expressão da HER2, segundo as directrizes da ASCO/CAP.

Tabela 12. Distribuição dos resultados relativos ao estado de amplificação do gene HER2, pelos métodos SISH e FISH.

Tabela 13. Dados dos cálculos do nível de concordância e respectivos intervalos de confiança entre as metodologias FISH e SISH, na amostra estudada.

1. Introdução

1.1 Carcinoma da Mama

1.1.1 Epidemiologia

A nível global, o cancro da mama é o cancro mais frequente na mulher (Figura 1.A), tendo sido diagnosticados 1,38 milhões de novos casos em 2008 que correspondem a cerca de 23% de todos os cancros em mulheres¹. Mais de metade destes casos ocorrem nos países industrializados tendo sido diagnosticados 361,00 novos casos na Europa (cerca de 27,3% dos cancro na mulher)¹. O registo deste valores elevados é devido, em parte, aos programas de rastreio onde são detectadas estas lesões numa fase muito precoce, algumas das quais poderiam nunca vir a ser diagnosticadas, ou então muito tardiamente².

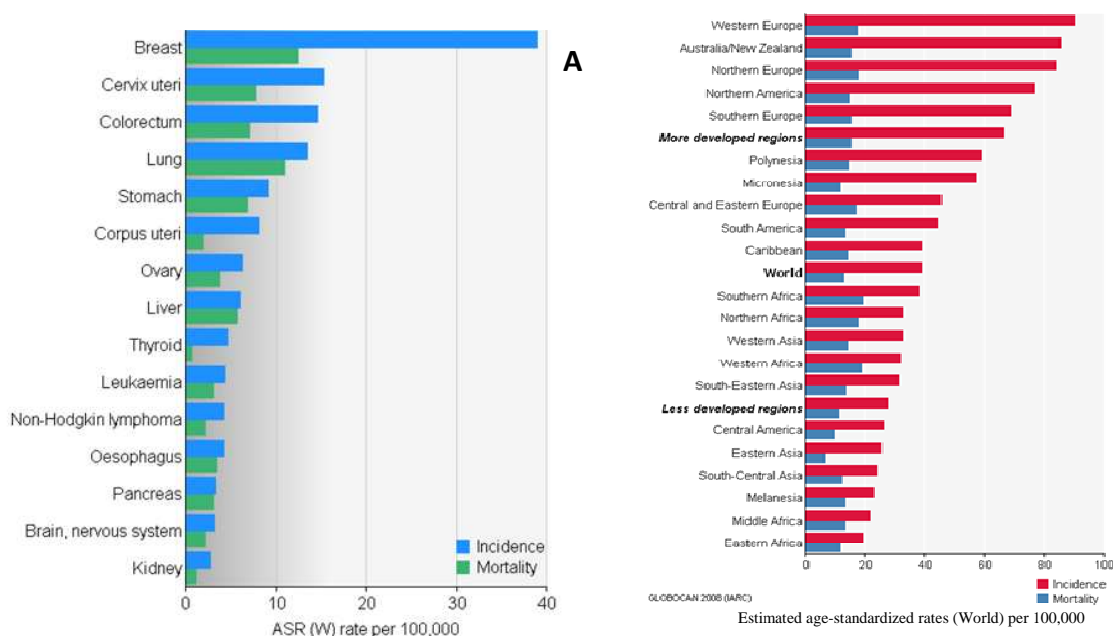


Figura 1. Taxa de incidência e de mortalidade por cancro (A) e por cancro mamário na mulher (B) a nível global. Adaptado da International Agency for Research on Cancer¹.

É mais comum nos países mais desenvolvidos mas tem-se notado um aumento na incidência nos países subdesenvolvidos, nomeadamente em África, América Latina e Ásia (Figura 1. B)¹.

O carcinoma da mama é fatal em 50% dos casos e é a principal causa de morte nas mulheres, registando cerca de 14% de todos os óbitos verificados no mundo por cancro¹, sendo a segunda causa de morte dos indivíduos deste sexo nos Estados Unidos da América (EUA)³.

Em Portugal, em 2008, foram diagnosticados 5333 novos casos, que representam cerca de 27,7% de todos os cancros na mulher, sendo a principal causa de cancro na mulher (Figura 2.A). Registaram-se nesse ano 1537 óbitos por 100.000 habitantes, que corresponde a 15,9% de

todas as mortes por cancro na mulher e a 6,3% de todas as mortes ocorridas por cancro (Figura 2.B)².

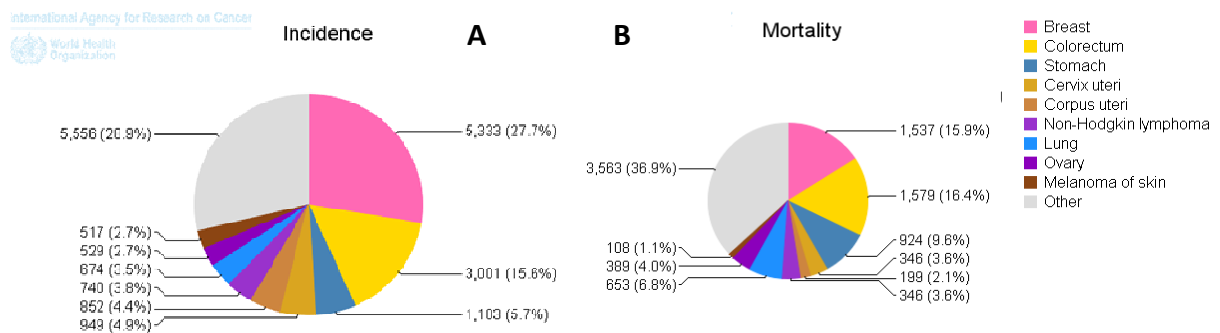


Figura 2. Taxa de incidência de cancro (A) e mortalidade por cancro (B) na mulher, em Portugal em 2008. Adaptado da International Agency for Research on Cancer¹.

1.1.2 Factores de risco

O cancro da mama é uma doença complexa que resulta da interacção de vários factores de risco, nomeadamente de factores ambientais, hormonais e genéticos. Os factores de risco mais relevantes para o desenvolvimento do cancro de mama estão registados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais factores de risco para o desenvolvimento do cancro da mama. Adaptado de Dixon 2006⁴

Factor de risco	Risco Relativo	Grupo de alto risco
Idade	>10	Idosos (> 65 anos)
Localização geográfica	5	Países Desenvolvidos
Idade da menarca	3	Antes dos 11 anos
Idade da menopausa	2	Após os 54 anos
Idade da 1ª gravidez	3	1ª criança aos 40
História familiar	>2	Cancro de mama em familiares de 1º grau, quando jovem
Doença benigna prévia	4-5	Hiperplasia atípica
Cancro na outra mama	>4	
pré-menopausa	0,7	Índice de massa corporal > 35
pós-menopausa	2	Índice de massa corporal > 35
Consumo de álcool	1,3	Consumo excessivo
Exposição a radiação	3	Exposição anormal há mais de 10 anos
Contraceptivos orais	1,24	Uso corrente
Terapia hormonal de substituição	3,4	Uso há mais de 10 anos

O tecido mamário, as hormonas e o estado dos receptores hormonais variam nas diferentes etapas da vida. É possível que os factores de risco individuais tenham efeitos distintos nas diferentes idades.

A **menarca precoce** e a **menopausa tardia**, isto é, um longo período fértil, aumenta o risco para desenvolvimento do cancro da mama. Mulheres que têm a menopausa após os 55 anos têm duas vezes risco aumentado para desenvolver cancro da mama comparativamente às mulheres que têm a menopausa antes dos 45 anos⁴.

Uma **idade tardia para a primeira gravidez**, assim como a nuliparidade aumentam o risco para o desenvolvimento do cancro da mama. O grupo de maior risco é o das mulheres que tiveram o primeiro filho após os 35 anos, mesmo em relação ao grupo das nulíparas^{1; 4}.

De entre 4 a 9% dos carcinomas da mama apresentam **História Familiar**, sendo uma percentagem significativa causada por mutações nos genes *breast cancer 1* (BRCA1) e *breast cancer 2* (BRCA2)⁵. Estes genes codificam proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de reparação do Ácido Deoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid* – DNA), tendo um efeito protector. Mutações nestes genes podem levar a uma reparação incorrecta do DNA e à instabilidade genómica, aumentando o risco de desencadear o processo neoplásico⁶. Por outro lado, uma percentagem significativa de cancros da mama apresenta sobre-expressão de alguns oncogenes, nomeadamente de genes codificadores de receptores dos factores de crescimento¹.

Algumas mutações em genes específicos têm sido relacionadas com o desenvolvimento de cancro da mama¹. Mulheres portadoras de um dos tipos de mutações descritas nos genes BCRA1, situado no braço longo do cromossoma 17, e BRCA2, situado no braço longo do cromossoma 13, têm um risco de 50 a 85% de desenvolver cancro da mama até aos 70 anos, sendo este risco de 11% para uma mulher de 70 anos sem mutações nesses genes⁵.

Indivíduos com mutações germinativas em outros dois genes, o TP53 e PTEN, que estão associados aos Síndromes Familiares de Li-Fraumeni e Cowden, respectivamente, têm um risco muito aumentado para o desenvolvimento de tumores, incluindo o cancro da mama⁷.

Uma mulher que tenha carcinoma da mama tem cinco vezes mais risco de desenvolver carcinoma na mama contralateral. Nos casos de carcinoma lobular o risco pode ser de 25 a 50%. A utilização de quimioterapia adjuvante diminui o risco do carcinoma da mama contralateral⁸.

Alguns estudos mostram que o **estilo de vida**, principalmente a terapia de substituição hormonal, a obesidade, a toma de contraceptivos orais e a dieta, pode estar associado ao desenvolvimento do cancro mamário⁴.

Algumas evidências sugerem que o uso de **terapia hormonal de substituição** reduz o risco de doença cardíaca coronária e a osteoporose em cerca de 50%. Contudo, o uso deste tipo de terapia durante mais de cinco anos aumenta 30 a 40 vezes o risco de desenvolvimento do cancro mamário⁴.

A **obesidade** em mulheres pós menopausa aumenta o risco para desenvolvimento do cancro da mama em cerca de 50%, enquanto que a obesidade antes da menopausa está associada a um ligeiro decréscimo do risco^{1; 4; 9}. A perda de peso ou manutenção da massa corporal ideal, a lactação, bem como a **actividade física regular** reduz o risco do cancro da mama na mulher, em cerca de 30%^{1; 9}.

Quanto à toma de **contraceptivos orais**, os resultados de diferentes estudos são controversos, parecendo que o risco desaparece após alguns anos sem tomar¹.

Uma **dieta** muito rica em lípidos e o consumo moderado de bebidas alcoólicas aumentam o risco do cancro da mama^{1; 8}.

A exposição a **radiações ionizantes**, ainda que em pequenas doses como por exemplo nos meios de diagnóstico por raios X, especialmente se ocorre no período de desenvolvimento mamário, é um factor de risco do cancro mamário⁴.

As hormonas têm um papel importante na progressão do carcinoma da mama porque modelam a estrutura e o crescimento das células epiteliais tumorais. Muitos tumores produzem hormonas, bem como factores de crescimento, que actuam localmente e podem estimular ou inibir o crescimento do tumor¹.

Tem-se tornado cada vez mais evidente que a desregulação de genes envolvidos no controlo do crescimento e na diferenciação celular podem levar ao crescimento e sobrevivência das células cancerígenas^{10; 11; 12}. Em alguns casos a desregulação é iniciada com a amplificação de um gene, seguida da sobre-expressão inadequada do produto proteico e alteração do normal funcionamento celular.

A carcinogénese compreende a aquisição de novas funcionalidades pelas células, podendo essas novas funções ser adquiridas por alterações num de muitos genes, como por exemplo, por mutações no gene TP53, por expressão dos genes codificadores dos receptores de estrogénios (RE) e dos receptores de progesterona (RP), assim como por sobre-expressão do gene codificador do receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano (Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 (HER2)). Estas últimas alterações podem resultar em sinais de crescimento e, conseqüentemente, em auto-suficiência¹².

A taxa de sobrevida por carcinoma da mama aos 5 anos varia de 50 a 90%, dependendo das características do tumor, do seu tamanho, da presença ou não de metástases e da acessibilidade ao tratamento, sendo de 73% nos países desenvolvidos e de 57% nos países subdesenvolvidos¹.

1.2 Diagnóstico histopatológico e grau histológico

A localização do carcinoma da mama é usualmente indicada em relação aos quadrantes da mama. Cerca de 50% dos carcinomas da mama situam-se no quadrante supero-externo, 15% no quadrante supero interno, 10% no quadrante inferior externo, 5% no quadrante inferior interno, 17% na área central e 3% são difusos, habitualmente multifocal. A localização na mama esquerda tem uma incidência superior em 13% relativamente à mama direita⁸.

O diagnóstico de carcinoma da mama é efectuado por exame clínico e/ou através da realização de mamografia. Cerca de 60% dos tumores mamários detectados por mamografia são palpáveis. Contudo, a mamografia permite a detecção de tumores de pequenas dimensões, com cerca de 1 a 2mm, bem como pela presença de microcalcificações, que correspondem a cerca de 50 a 60% dos casos⁸.

O diagnóstico histopatológico pode ser feito por citologia, por aspiração de escorrência mamilar, que apresenta muitas limitações, ou por aspiração de lesão por agulha fina, que quando efectuada por alguém experiente oferece muito bons resultados. A aspiração por agulha fina apresenta uma sensibilidade de 87 % e uma especificidade de 100% tendo um valor preditivo de 100% em diagnósticos positivos e de 60 a 90% em diagnósticos negativos⁸.

A técnica de biopsia aspirativa pode ser utilizada para a colheita de pequenos fragmentos que servirão de base para realizar o diagnóstico anátomo-patológico. Após o estabelecimento deste diagnóstico, a paciente pode ser submetida a procedimento cirúrgico, que pode resultar em tumorectomia ou em mastectomia.

O carcinoma corresponde a 10% de todas as lesões mamárias diagnosticadas por exame anátomo-patológico¹³. O **tipo histopatológico** é uma avaliação qualitativa segundo a qual um tumor é classificado de acordo com o tipo do tecido ou células sem alterações a que se assemelha. O **grau** de um tumor é a avaliação qualitativa da extensão da sua diferenciação¹⁴. Na Tabela 2 é apresentada de uma forma resumida a classificação dos tumores da mama, segundo a Organização Mundial de Saúde,¹⁵.

Tabela 2. Classificação dos tumores da mama segundo a Organização Mundial de Saúde. (Adaptado de The World Health Organization Histologic Typing of Breast Tumors, 2nd ed.:Am. J. Clin. Pathol. 78:806, 1982)

NÃO INVASOR (Não Infiltrativo)
Carcinoma Intraductal;
Carcinoma Intraductal Papilar
Carcinoma Lobular in situ
INVASOR (Infiltrativo)
Carcinoma Ductal Invasor (sem outra especificação)
Carcinoma Lobular Invasor
Carcinoma Medular
Carcinoma Mucinoso
Doença de Paget
Carcinoma Tubular
Carcinoma Adenóide Cístico
Comedocarcinoma
Carcinoma Apócrino
Carcinoma Papilar Invasor

O **Grau microscópico** das neoplasias malignas da mama tem sido avaliado ao longo dos anos através de dois sistemas distintos: o sistema **Bloom and Richardson** e o sistema **Black**. O sistema de Black é baseado no grau de atipia do tumor, enquanto o sistema de Bloom and Richardson, mais utilizado, tem como fundamento os efeitos arquiteturais (formação de túbulos) e as alterações nucleares do tumor, tendo sido posteriormente modificado, dando origem ao sistema de **Nottingham**, que incorpora a avaliação do índice mitótico⁸.

O sistema de Nottingham utiliza três critérios de avaliação: as formações tubulares, o pleomorfismo nuclear e o índice mitótico do tumor. Cada um dos critérios é avaliado em 3 *scores* (1, 2, e 3), podendo um tumor atingir uma pontuação máxima de 9. A avaliação do tumor pode levar aos seguintes graus: 3 a 5 pontos - Grau I; 6 a 7 pontos – Grau II e 8 a 9 pontos – Grau III. Na Tabela 3 encontram-se descritos os critérios específicos dos pontos avaliados⁸.

Tabela 3. Classificação do Grau Microscópico do Carcinoma da Mama segundo o Sistema de Nottingham. Adaptado de Rosai, 2004 (Rosai and Ackerman's Surgical Pathology; J Rosai; 2004; 2nd)

Grau Microscópico de Carcinoma da Mama: Sistema Nottingham (Bloom and Richardson modificado)	
Formação de Túbulos	
1 ponto	Formação de túbulos em +75% do tumor
2 pontos	Formação de túbulos em 10 a 75% do tumor
3 pontos	Formação de túbulos em -10% do tumor
Pleomorfismo Nuclear	
1 ponto	Núcleos com variação mínima no tamanho e forma
2 pontos	Núcleos com variação moderada no tamanho e forma
3 pontos	Núcleos com variação acentuada no tamanho e forma
Índice Mitótico	
1, 2 ou 3 pontos	De acordo com a Tabela 4

O índice mitótico, referido anteriormente, pode diferir consoante o microscópio que sirva para a observação das preparações, tendo sido estabelecidos critérios de observação de forma a uniformizar os dados emanados dessa análise (Tabela 4)⁸.

Tabela 4. Atribuição de pontuação pelo Índice Mitótico contado de acordo com a área do campo, usando vários modelos de microscópios. Adaptado de Rosai, 2004 (Rosai and Ackerman's Surgical Pathology; J Rosai; 2004; 2nd)

	Leitz Ortholux	Nikon Labphot	Leitz Diaplan
Objectiva	x25	x40	x40
Diâmetro do Campo (mm)	0,59	0,44	0,63
Área do Campo (mm ²)	0,274	0,152	0,312
Índice Mitótico			
1 ponto	0-9	0-5	0-11
2 pontos	10-19	6-10	12-22
3 pontos	>20	>11	>23

Nota: A contagem deve ser feita na periferia do tumor e deverá iniciar-se em área de maior actividade mitótica; Devem ser contados 10 campos de grande ampliação na mesma área; O campo deve estar preenchido por tecido tumoral; Evitar áreas mal preservadas.

1.3 Estadiamento e Indicadores de Prognóstico

Os sistemas de estágio têm em consideração a extensão da disseminação do tumor no organismo e servem como guias para o clínico decidir estratégias de tratamento apropriadas e para o prognóstico.

Um dos sistemas de classificação do estadiamento das neoplasias mais utilizados é a classificação TNM, que avalia o tamanho do tumor, o envolvimento dos gânglios regionais e a existência de metástases à distância¹⁴, estando as suas características mais relevantes apresentadas de forma resumida na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização do Estadiamento TNM, segundo as recomendações AJCC. (Adaptado de Cancer Staging Handbook, AJCC, 7th edition, Springer, 2010)

Tumor Primário (T)	
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1, T2, T3, T4	Aumentando o tamanho do tumor primário
TX	Não é possível avaliar o tumor primário
Gânglios linfáticos (N)	
N0	Sem gânglios linfáticos metastizados
N1, N2, N3	Aumentando o nº ou extensão dos gânglios envolvidos
Nx	Não é possível avaliar os gânglios linfáticos
Metástases à distância (M)	
M0	Sem metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância
Mx	Não é possível avaliar a existência de metástases

O tamanho do tumor, o tipo e grau histológico, o estado dos gânglios, a invasão vascular e o estado de receptores endócrinos (receptores de estrogénio e receptores de progesterona) e do receptor do factor de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) conduzem a um prognóstico preditivo e recomendações de terapias adjuvantes para pacientes com um estágio precoce de cancro da mama^{16; 17}.

A taxa de sobrevivência a 30 anos das mulheres com determinados tipo histológicos de carcinomas invasores, nomeadamente tubular, mucinosos, medulares, lobulares e papilares, é mais de 60%, enquanto mulheres com cancro da mama inclassificável é menor do que 20%¹³.

A presença de células tumorais dentro de espaços vasculares (linfáticos ou pequenos capilares) que rodeiam o tumor está associada à presença a um mau prognóstico quer haja ou não metástases em gânglios linfáticos. A presença de células tumorais em vasos linfáticos da derme também está fortemente associada com a aparência de cancro inflamatório, que é um indicativo de muito mau prognóstico¹³.

Alguns estudos mostram que a invasão vascular é um importante factor de prognóstico, particularmente nas mulheres com cancro mamário sem gânglios linfáticos metastizados^{9; 18}.

De acordo com o Consenso de St Gallen¹⁹, a determinação do estado hormonal dos receptores de estrogénio (RE) e dos receptores de progesterona (RP) por imunocitoquímica, isto é a avaliação da expressão dos RE e RP em cortes de tecido tumoral, já não é mais considerado um factor de prognóstico, mas sim um factor preditivo relevante na selecção para o tratamento¹⁹. A expressão de níveis elevados de RE está associada a uma boa resposta ao tratamento com Tamoxifeno^{9; 18}.

Assim, actualmente, a determinação do estado hormonal é uma prática da rotina do laboratório de Anatomia Patológica, devendo ser incluída a percentagem de células tumorais positivas para os RE e RP nos relatórios, de forma a seleccionar as pacientes com cancro da mama que melhor responderão à terapêutica hormonal.

A amplificação do gene HER2 e /ou sobre-expressão do seu produto proteico está presente em 25 a 30% dos cancros da mama^{13; 20}, e está associada a uma baixa sobrevivência dos pacientes com metástases nos gânglios linfáticos axilares^{9; 18; 20}.

A determinação do estado do gene HER2 em pacientes com cancro da mama é uma prática da rotina devido a este biomarcador ser um factor preditivo para a resposta à quimioterapia e agentes dirigidos ao HER2, nomeadamente o anticorpo monoclonal Transtuzumab e o inibidor da tirosina cinase, o Lapatinib^{9; 18; 20}.

A taxa de proliferação celular é um marcador uma vez que tumores com taxas de proliferação altas têm um pior prognóstico. Até ao momento ainda não foi estabelecido um método standard para avaliação da taxa de proliferação. Contudo, é prática na rotina laboratorial proceder à contagem de células em mitose, a qual está incluída no sistema do Nottingham, como referido anteriormente⁸. Adicionalmente, a proliferação celular pode ser estimada através da percentagem de células em fase S encontradas por citometria de fluxo⁸ e pela detecção da expressão de proteínas celulares produzidas durante o ciclo celular, particularmente da Ki-67 e ciclinas²¹.

1.4 O gene HER2

1.4.1 Caracterização do HER2

O gene HER2 é um proto-oncogene localizado no braço longo do cromossoma 17 (CR17) e foi descoberto, conjuntamente com a família erb dos receptores tirosina cinase, por Weinberg e colaboradores^{11; 22}.

O gene HER2 codifica uma glicoproteína transmembranar de 185KDa, a HER2 com actividade intracelular de tirosina-cinase que tem um papel de regulação nas células com funcionamento normal²³. Esta proteína está expressa em baixos níveis numa variedade de epitélios normais, que incluem o epitélio do ducto mamário. A proteína HER2 distribui-se pela membrana celular e pela ligação de factores de crescimento aos receptores HER2, ocorre uma via de sinalização, desde o exterior da célula até ao núcleo, que orientam para o crescimento celular normal^{11; 24}.

1.4.2 Papel do HER2 no desenvolvimento do cancro da mama

A sequência habitual da transformação oncogénica parece iniciar-se com a amplificação do gene HER2 nas células epidérmicas, originando um número de cópias do gene duas vezes mais do que é habitual, podendo ser superior a dez cópias por núcleo. A amplificação do gene HER2 leva a um aumento de transcritos do gene (aumento dos níveis de ARNm para a HER2) e, consequentemente, a um aumento da síntese proteica do HER2. Deste modo a amplificação do gene HER2 leva a sobre-expressão da proteína HER2 membranar (receptores), que leva, provavelmente, à activação constitutiva dos receptores homodímeros do HER2, sem necessidade de ligação aos ligandos. Como resultado ocorre o crescimento celular desordenado, a transformação oncogénica, em determinadas situações, dando origem ao cancro¹¹.

A amplificação do gene HER2 e/ou a sobre-expressão da proteína está presente em 10-34% de tumores malignos primários da mama^{11; 25; 26; 27 28; 29}, está associada ao comportamento agressivo do tumor²⁸, ao aumento de proliferação celular, mobilidade celular, invasão tumoral,

progressão de metastização regional para distante, angiogénese acelerada e apoptose reduzida¹¹.

1.4.3 HER2 como biomarcador preditivo de terapia

O estado do gene HER2 nos carcinomas da mama é usado como um factor prognóstico, um factor preditivo e um factor selectivo para o tratamento com trastuzumab (Herceptin®, Genetech, San Francisco), um anticorpo monoclonal humanizado dirigido para o domínio extracelular do receptor do HER2,^{26;}³⁰. Este tipo de tratamento pode ser

combinado ou não com quimioterapia (QT) no tratamento de doentes com carcinoma da mama com amplificação do gene HER2 (Figura 3)^{10; 27; 31; 32}. Assim, é de extrema importância que o estudo do estado do HER2 seja efectuado com acuidade, reprodutibilidade e precisão^{10; 33}.

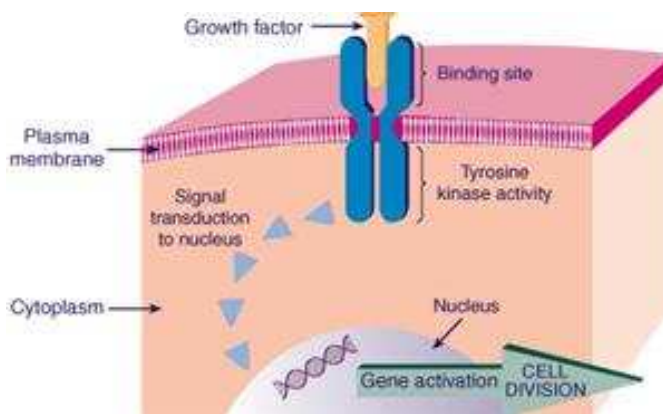


Figura 3. Esquema explicativo da actividade do gene de um receptor tirosina cinase
(Fonte: http://www.roche.pt/sitestematicos/her2/index.cfm/her2_e_o_cancro/o-que-e-o-her2/)

1.4.4 Métodos para avaliação da sobre-expressão e/ou amplificação do HER2

A amplificação do gene HER2 foi inicialmente detectada em amostras congeladas de tumor de mama por *Southern blot*, cujos resultados mostraram uma correlação positiva com a sobre-expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e da proteína HER2²⁹.

A avaliação da expressão da proteína HER2 pode ser efectuada por imunohistoquímica (IHQ), pelo imuno-ensaio *sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e por electroforese capilar. Outros métodos que permitem indirectamente avaliar a expressão da proteína é a avaliação dos níveis dos transcritos para a referida proteína, através da reacção de síntese pela transcriptase reversa seguida da reacção em cadeia pela polimerase (reverse transcriptase polymerase chain reaction – RT-PCR) e a avaliação da amplificação do gene, realizada por métodos que se baseiam na hibridação *in situ* (HIS), nomeadamente a hibridação *in situ* por fluorescência (Fluorescence *in situ* Hybridization – FISH), hibridação *in situ* por cromogénio (chromogenic *in situ* hybridization – CISH) e a hibridação *in situ* com prata (Silver enhancer *in situ* Hybridization – SISH)¹¹.

Uma vez que da avaliação de HER2 resulta a selecção das pacientes que serão sujeitas a terapêuticas dirigidas com trastuzumab cujos benefícios são significativos, dado o alto custo e os potenciais riscos de cardiotoxicidade do medicamento requer-se que o teste do estado do HER2 seja o mais exacto possível²⁹.

As duas metodologias laboratoriais mais utilizadas são a avaliação da expressão da proteína, por IHQ, e a avaliação do estado de amplificação do gene, por FISH³³.

1.4.4.1 Imunohistoquímica

A IHQ é o método utilizado por excelência no laboratório de Anatomia Patológica para avaliar a sobre-expressão da proteína HER2 nas membranas das células tumorais. Quando a expressão desta proteína membranar é normal não é detectada por imunohistoquímica e corresponde a um estado de não amplificação do gene HER2. Uma vez que os resultados obtidos por imunohistoquímica vão ajudar a direccionar a terapia da paciente, é necessário ter em consideração alguns factores que influenciam a efectividade desta técnica, nomeadamente: o clone do anticorpo monoclonal utilizado para a detecção da HER2, o fixador usado bem como o tempo de fixação, o método de recuperação antigénica aplicada aos tecidos^{10; 29}. Adicionalmente, a interpretação dos resultados está dependente do observador/avaliador, sendo um pouco subjectiva, facto que se repercute nos resultados finais da leitura. Actualmente, existem critérios para a classificação dos resultados obtidos²⁹.

1.4.4.2 Hibridação *in situ* (HIS)

A Hibridação *in situ* é um método que permite determinar anomalias numéricas e anomalias estruturais dos cromossomas, bem como amplificações genicas, através da utilização de oligonucleotídeos complementares de uma região específica do cromossoma em estudo. Relativamente a outras técnicas de biologia molecular a HIS confere a vantagem da visualização e determinação do número de cópias por observação microscópica no contexto morfológico. Pode ser executada directamente em núcleos em metáfase e/ou interfase, revelando-se como uma técnica importante no estudo da amplificação génica em tecidos³⁴. Consoante o sistema revelador utilizado para a detecção dos híbridos, esta técnica tem um nome que reflecte o sistema revelador utilizado.

A metodologia de HIS pode fornecer resultados falso negativos ou de menor amplificação quando o intervalo de tempo que medeia entre a colheita da peça e a correcta fixação é longo, diminuindo a quantidade de cópias detectáveis por aquela metodologia, embora os resultados obtidos por IHQ nos mesmos casos possam ser claramente expressivos³⁵.

1.4.4.2.1 *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH)

A FISH está descrita como a metodologia *gold standard* para o estudo da amplificação genómica, por ser uma técnica muito sensível³⁶. A metodologia FISH pode ser utilizada para quantificar o número de cópias de um dado gene em núcleos das células do tumor¹⁰. Vários estudos mostram que a FISH é a metodologia mais exacta, reprodutível e com maior precisão para avaliação da amplificação do gene HER2 na rotina laboratorial de diagnóstico³².

Contudo, a FISH apresenta alguns inconvenientes no âmbito da anatomia patológica, principalmente, por não ser possível visualizar os achados genómicos no contexto morfológico^{33; 37}. Outras limitações, tais como, o elevado custo do equipamento utilizado^{33; 37}, a perda do sinal fluorescente ao longo do tempo, que inviabiliza o arquivo dos casos³³, a dificuldade de standardização dos sistemas de interpretação, tornando difícil o intercâmbio de resultados entre vários laboratórios³⁸, levaram ao desenvolvimento de novos sistemas de revelação.

De forma a se poder interpretar facilmente, principalmente em cortes histológicos, e semi-quantificar os resultados obtidos por FISH, é utilizada uma sonda centromérica para o cromossoma 17 (CEN17). A contabilização dos sinais emitidos por esta sonda permite discriminar células intactas das células partidas e calcular o número de cópias do gene HER2 presentes numa célula tumoral e aplicar os critérios estabelecidos por *American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists (ASCO/CAP)*²⁹.

1.4.4.2.2 Chromogenic in situ hybridization (CISH)

Em 2000, foi desenvolvido um novo método de hibridação (chromogenic in situ hybridization – CISH), apresentado por Tanner e colaboradores, em que, usando o mesmo princípio da FISH, a visualização dos híbridos é realizada por uma reacção cromogénica catalisada por uma peroxidase, a *Horseradish Peroxidase* (HRP), como alternativa à fluorescência³³. Este método foi muito apreciado pelos patologistas dado possibilitar visualizar a marcação por ISH no contexto da morfologia do tecido em estudo, sendo esta marcação semelhante à obtida por IHQ. Através deste método, os patologistas podem detectar aberrações genéticas, bem como a histopatologia³⁹.

Os resultados da coloração de CISH podem ser claramente visualizados com um microscópio de campo claro normal e uma objectiva de 40x. Uma vez que a coloração obtida pela oxidação da diaminobenzidina (DAB) é permanente, as preparações obtidas podem ser armazenadas durante um período longo, originando um registo do exame permanente. Com a metodologia de imunodeteção CISH, a análise de resultados é rápida e fácil⁴⁰.

Inicialmente, o principal inconveniente da CISH, comparativamente à FISH, foi não permitir a detecção do CR17, detectando apenas o gene HER2. Este problema foi solucionado com a introdução recente de um controlo interno através da marcação na mesma amostra e lâmina de uma sonda centromérica do CR17, no entanto quando ocorre marcação inespecífica no tecido adjacente a nitidez de marcação diminui.

Vários estudos demonstraram elevada concordância de resultados entre FISH e CISH (entre 96 e 100%), revelando-se esta última como uma alternativa viável à metodologia FISH^{10; 25; 26; 40; 41; 42; 43}.

1.4.4.2.3 Silver enhanced in situ Hybridization (SISH)

Recentemente foi implementado outro método alternativo ao FISH, que permite a avaliação do número de cópias genómicas com visualização simultânea da morfologia. Este método é designado por *Silver enhanced in situ Hybridization* (SISH) e também é baseado no princípio da ISH em que a sonda utilizada está marcada, sendo a detecção da hibridação realizada por um sistema enzimático metalográfico, que leva à produção de pontos pretos de prata metálica discretos e que são visualizados ao microscópio de luz³³. Este método é completamente automatizado, o que confere consistência à metodologia e resultados⁴⁴.

A deposição de prata metálica no sítio da reacção surge pela acção da enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) e presença de acetato de prata, hidroquinona e peróxido de hidrogénio (H₂O₂)³³. Uma das principais desvantagens desta técnica, quando realizada em

tecidos, é a dificuldade na interpretação dos sinais, devido aos núcleos das células não estarem intactos e todos no mesmo plano.

O desenvolvimento de um sistema SISH de dupla marcação, com uma sonda dirigida para o gene alvo e outra sonda dirigida para sequência específica da região centromérica do cromossoma onde está localizado o gene alvo, ajudou a ultrapassar a limitação da CISH. Através do sistema *Dual-Color SISH red ISH* é possível discriminar, microscopicamente, as células tumorais aneuploides das células tumorais com núcleos não intactos ou sobrepostos, assim como diferenciar uma amplificação de uma pseudo-amplificação génica, o que facilita a interpretação e, consequentemente, a rapidez na obtenção de resultados mais precisos^{33; 36}.

Estudos recentes mostram uma boa correlação de resultados do estudo do gene HER2 obtidos por SISH com os obtidos por FISH em doentes com carcinoma invasivo da mama^{44; 45}.

O SISH mostra ser um método robusto, de interpretação fácil dos resultados, permitindo em muitos casos, por mostrar a morfologia do tecido, avaliar com a observação em pequena ampliação se o caso é amplificado ou não sem necessidade de quantificar os sinais⁴⁴.

O desenvolvimento da automatização do método possibilita a reprodutibilidade dos resultados, possibilitando a visualização das duas marcações simultaneamente na mesma lâmina (CEN17 e HER2), facto que não acontecia com o CISH, em que é necessário uma segunda lâmina para a sua avaliação³³.

Os resultados da metodologia SISH podem ser afectados ou inviabilizados quando a desparafinação dos cortes não é adequada, pois resulta em artefacto na hibridação nuclear, facto que não possibilita visualizar todos os sinais existentes no núcleo das células⁴⁶, muitas vezes denominado de Nuclear Bubbling (Figura 8).

1.5 Tratamento

A QT e a radioterapia são os tratamentos sistémicos que têm sido mais utilizados para combater o cancro. No entanto, ainda que continuem a ser os tratamentos mais utilizados e com comprovada eficácia, estão associados a vários efeitos secundários.

As outras modalidades terapêuticas para o cancro da mama incluem a cirurgia, a terapêutica hormonal e a terapêutica biológica e a imunoterapia.

Durante muitos anos o estado dos RE foi o indicador para a administração de terapia hormonal às pacientes com carcinoma da mama, sendo vistas como mais agressivas as neoplasias que expressavam RE. Contudo, o estado de RE indica que metade das doentes responde à terapia, mas é incapaz de prever quais as doentes que vão responder¹⁰. O estudo do estado dos receptores hormonais não foi abandonado, sendo efectuado para orientar na terapêutica conjunta com outros fármacos e para caracterizar o quadro de risco.

Vários factores afectam o sucesso da terapêutica, como o tipo, o tamanho e proliferação do tumor primário, o número de gânglios linfáticos envolvidos, a expressão aumentada de determinados oncogenes, o estado dos RE e/ou RP e do HER2.

Para colmatar os insucessos das terapias sistémicas e com a experiência das terapias com base nos RE, foram desenvolvidos novos métodos com mecanismos de acção inovadores, direccionados e com menos efeitos secundários. Para a sua aplicação torna-se necessário

efectuar uma avaliação segura de biomarcadores e factores de risco a que cada doente esteja sujeita.

Para o grupo de tumores da mama classificados como HER2 positivos existe a terapêutica dirigida à proteína HER2 que se encontra sobre-expressa^{29; 31}.

O conhecimento do estado do gene HER2 e/ou da sobre-expressão da proteína nas doentes com cancro da mama invasivo permite aos médicos tomarem decisões mais fundamentadas, para melhorar o tratamento geral destes doentes.

A sobre-expressão de HER2 está associada a pior prognóstico, alta taxa de recorrência e mortalidade, em doentes a quem foi diagnosticado carcinoma da mama que não receberam qualquer terapia adjuvante. Assim o estado de HER2 poderá ser tido em conta na decisão clínica, a par de outros factores prognósticos, favorecendo a terapia adjuvante⁴⁷.

O HER2 parece estar relativamente associado a resistências às terapias endócrinas em geral, podendo ser selectivo para as terapias moduladoras de RE, como o Tamoxifeno e talvez não às terapias de diminuição de estrogénios, como os inibidores de aromatase²⁹.

O HER2 também aparece como preditivo de resistência ou sensibilidade para diferentes tipos de agentes quimioterápicos. Os agentes que têm o HER2 como alvo são marcadamente efectivos em casos metastáticos e em situação adjuvantes. Trastuzumab (Herceptin®, Genetech, San Francisco) um anticorpo monoclonal humanizado contra o domínio extracelular do HER2, melhora as taxas de resposta, o tempo de progressão e mesmo sobrevida quando usado só ou adicionado a QT em doentes com carcinoma da mama metastático^{28; 29; 47}.

O trastuzumab foi aprovado em 1998 pela Food and Drugs Administration (FDA) para o tratamento da doença metastática²⁹. Foi inicialmente administrado em terapia adjuvante a pacientes com carcinoma da mama que apresentavam envolvimento ganglionar. Actualmente é também administrado a pacientes sem envolvimento ganglionar pela neoplasia maligna¹¹.

O trastuzumab não está associado aos efeitos adversos típicos da QT, tais como alopecia, mielossupressão, náuseas e vómitos. No entanto tem mostrado hipersensibilidade e cardiotoxicidade, principalmente insuficiência cardíaca congestiva ($\pm 1,4\%$). Um pico de recorrência surge 18 a 24 meses após a cirurgia. O tratamento parece mais efectivo quando feito de forma prolongada, ao longo de um ano, tal qual o Tamoxifeno²⁸.

Em muitos estudos clínicos, foi demonstrado que a amplificação e/ou sobre-expressão do HER2 está associada a resultados clínicos insuficientes nas mulheres com cancro da mama invasivo e está correlacionada com diversas variáveis de prognóstico negativas, incluindo o estado negativo de RE, elevada fracção da fase S, envolvimento ganglionar, p53 mutado e um elevado grau nuclear⁴⁴.

Em diversos estudos, as doentes com cancro invasivo da mama (tanto com gânglios envolvidos como com gânglios não envolvidos) com o gene HER2 amplificado, apresentaram uma taxa de sobrevivência geral reduzida e maior frequência de reincidência^{11; 28}.

O facto de se conhecer o estado de HER2 não invalida a avaliação dos receptores hormonais, pois a terapêutica ministrada poderá ser combinada, pelo que se deve avaliar o estado de RE e RP em todas as neoplasias malignas da mama, pois segundo os consensos da comunidade oncológica (St. Gallen, 2009)¹⁹, qualquer positividade de RE é considerado suficiente para justificar o uso da terapêutica hormonal adjuvante às pacientes, uma vez que os

casos com expressão RE positiva em mais de 50% das células tumorais correspondam aos casos com melhor resposta endócrina¹⁹.

No caso da expressão de receptores de progesterona (RP) foi considerado o seu valor prognóstico, mas menos importante como preditivo da resposta ao tratamento (por ex: Tamoxifeno)¹⁹.

Relativamente ao tratamento cirúrgico do carcinoma da mama devem ser avaliadas as margens cirúrgicas, bem como o gânglio sentinela. Assim, deve-se re-excisar se o carcinoma invasor ou carcinoma ductal *in situ* (CDIS) estiver presente na margem cirúrgica, sendo desnecessário no caso de carcinoma lobular. Não é de efectuar o esvaziamento axilar à paciente no caso de o gânglio sentinela ser negativo¹⁹.

Ainda que não seja uma prática habitual, não está evidenciada a vantagem na mastectomia contra lateral em pacientes com carcinoma da mama¹⁹.

Existe uma falta de marcadores específicos na resposta individual aos agentes QT, pelo que muitos regimes distintos são aplicados. Os níveis baixos de RE, a sobre-expressão de HER2 e o aumento de proliferação são indicadores preditivos da resposta à QT em geral¹⁹.

A QT está indicada para doentes pós-mastectomia se do esvaziamento axilar resultarem quatro ou mais gânglios envolvidos pelo tumor. Às pacientes jovens com CDIS de baixo grau e cujas margens estejam livres é de evitar a quimioterapia. A terapia endócrina sem QT deverá ser considerada nas doentes com tumores pequenos, com gânglios não envolvidos e com expressão de RE¹⁹.

Nos casos de tumores HER2 negativos, com expressão de RE, com terapia endócrina, a indicação para QT será ponderada consoante os factores de risco.

Para as doentes cujos tumores sejam considerados “triplo negativos”, a que corresponde ausência de sobre-expressão para HER2, ausência de expressão de RE e RP, não existem alternativas válidas, pois enquadram-se no grupo de risco elevado. A este fenótipo está ainda associada a mutação BRCA1¹⁹

A demonstração da amplificação do gene HER2 e/ou sobre-expressão da proteína é essencial para a selecção de doentes para a terapêutica com o trastuzumab. Os estudos clínicos demonstraram que os doentes com cancro da mama com uma elevada sobre-expressão de proteína HER2 e/ou amplificação do gene são os mais beneficiados com o trastuzumab. A determinação da amplificação do gene HER2 e/ou a sobre-expressão da proteína é necessária para as doentes com cancro da mama invasivo, para quem a terapêutica com o trastuzumab está a ser considerada e é clinicamente indicada^{28; 48}.

2. Objectivos do trabalho

Estabelecer um protocolo para a realização de metodologia SISH em plataforma automática no Hospital Pedro Hispano, para realizar a caracterização do gene HER2 nas casos de neoplasia maligna da mama de forma segura e poder auxiliar na decisão clínica e orientação terapêutica.

Obtenção de resultados segundo os parâmetros e orientações da ASCO/CAP, quando comparados com outra metodologia / resultados de laboratório referência, que permitam a validação de SISH como um método de determinação do estado do HER2.

Obtenção de resultados por SISH estatisticamente compatíveis com os resultados apresentados em estudos anteriormente publicados.

3. Material e métodos

3.1 População em estudo

No presente estudo foram seleccionados 69 casos de arquivo relativos a mulheres em que foi diagnosticado carcinoma da mama no ano 2009 no Hospital Pedro Hispano.

O tecido enviado para estudo no Serviço de Anatomia Patológica, referente a cada caso, foi proveniente de biopsias incisionais (15 casos), biopsias excisionais (14 casos), sendo o restante colhido de peças de mastectomia.

As fichas das pacientes foram consultadas para colheita de alguns dados clínico-patológicos relevantes para o presente estudo, estando sujeitos a tratamento estatístico e garantida a confidencialidade dos mesmos durante a realização do estudo.

3.2 Amostras

Os fragmentos de tecido colhidos para diagnóstico anátomo-patológico foram fixados em formol a 10% tamponado pH7,6, processados e incluídos em parafina, de acordo com os protocolos standardizados no Serviço. O tempo de fixação dos fragmentos de tecido variou entre 6 e 48 horas. De cada caso foi seleccionado um bloco de parafina, através da observação das respectivas preparações histológicas coradas pela Hematoxilina Eosina (HE). De cada bloco seleccionado foram realizados seis cortes seriados de 3 µm de espessura; um dos cortes foi estendido numa lâmina de rotina para proceder à coloração de HE e os restantes cortes foram estendidos em lâminas carregadas positivamente (Superfrost® Plus +/-; Menzel-Gläser, Braunschweig) para proceder a imunohistoquímica e os métodos de hibridação *in situ*.

3.3 Avaliação da expressão do RE, RP e HER2

A avaliação dos receptores de estrogénio, de progesterona e da proteína HER2 foi realizada por imunohistoquímica na plataforma automática Benchmark XT (Ventana, Tucson) utilizando o anticorpo monoclonal (mAb) de coelho anti-HER2/neu (clone 4B5, Ventana, Tucson) o mAb de coelho anti-RE (clone SP1, Cell Marque, Rocklin) e mAb de coelho anti-RP (clone RP-2C5, Zymed, Carlsbad).

As imunocolorações dos RE, RP e HER2 foram realizadas conjuntamente com um corte histológico de linhas celulares provenientes de tumores que expressam os biomarcadores em quantidades diferentes, previamente testados, avaliados e processados no Serviço, que serve de controlo positivo da imunocoloração e de referência para análise microscópica da respectiva expressão nas amostras em estudo.

Após a desparafinação dos cortes histológicos na solução comercial EZ Prep® (Ventana, Tucson) seguida de lavagem num tampão de lavagem comercial previamente diluído (Reaction Buffer Concentrate 10X, Ventana, Tucson), foi efectuado o bloqueio das peroxidases endógenas numa solução aquosa de peróxido de hidrogénio a 0,04%. Após a lavagem dos cortes histológicos em tampão lavagem comercial, foi realizada a recuperação antigénica numa solução tampão comercial (CC1®, Ventana, Tucson) durante 60 minutos a 98°C. Após

arrefecimento da solução tampão à temperatura ambiente, os cortes histológicos foram lavados em tampão de lavagem comercial. Os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo monoclonal primário a 37°C, nas condições registadas na Tabela 6. Em seguida os cortes histológicos foram incubados com Universal HRP Multimer (Ventana, Tucson), que contém uma mistura de anticorpos (IgG e IgM de cabra anti-ratinho e cabra anti-coelho) marcados com HRP. A revelação do produto da reacção final foi efectuada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) durante 8 minutos. Após lavagem em água corrente e água destilada os cortes foram contrastados com Hematoxilina II (Ventana, Tucson) durante 4 minutos, seguida de uma diferenciação por uma lavagem no Reagente Bluing (Ventana; Tucson). Depois de desidratados e diafanizados, os cortes foram montados em meio de montagem sintético, Quick-D (Klinipath, Geel, Belgium). Ao microscópio óptico de campo claro a imunomarcacção aparece com uma cor castanha.

Tabela 6. Registo do clone dos anticorpos monoclonais usados, diluicção e tempos de incubacção e de recuperaçção antigénica.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluicção (ASB 1%)	Tempo de incubacção (minutos)	Tempo de recuperaçção antigénica (minutos)
RE	Cell Marque	SP1	1:100	40	60
RP	Zymed	RP-2C5	1:100	32	60
HER2	Ventana	4B5	RTU	16	60

Legenda: ASB- albumina sérica bovina; **RE-** receptores de estrogénio; **RP-** receptores de progesterona; **HER2-** Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 ; **RTU-** ready to use (pronto a usar).

3.4 Avaliacção do estado do gene HER2

A avaliacção do estado do gene HER2 foi realizada por hibridacção *in situ*, nomeadamente pelos métodos *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH) e pelo *Silver Enhanced in situ Hybridization* (SISH).

FISH. A metodologia utilizada foi de dupla marcaçção, tendo sido utilizadas duas sondas complementares para sequências específicas do gene HER2 e da região centromérica do cromossoma 17 (ON ERBB2, HER2/Neu (17q12)/SE 17 red/green, ref KI-10701, Kreatech, San Francisco). Os cortes utilizados foram obtidos a partir dos mesmos blocos utilizados nos estudos de HE, IHQ e SISH. O método FISH foi realizado num laboratório externo de referência.

SISH. Antes de proceder ao estudo foi realizada a optimizacção do método SISH em cortes de linhas celulares tumorais fixadas em formol a 10% tamponado e que expressam o HER2 em diferentes quantidades (Ventana, Tucson). Estas preparacções foram usadas, também, como controlo positivo das imunocoloracções e como uma referência para a análise microscópica da expressão do HER2 nas amostras em estudo. Como controlo dos procedimentos laboratoriais do Serviço foi utilizado um corte histológico de um bloco com fragmentos de diferentes casos previamente classificados com os quatro *scores* (0, 1, 2 e 3) para o estado do gene HER2.

A metodologia SISH foi efectuada na plataforma automática Benchmark XT (Ventana, Tucson), e foram corados segundo o protocolo do fabricante do kit de detecção para as sondas

INFORM HER2 DNA e CEN17. A sonda HER2 DNA está conjugada com hapteno dinitrofenol (DNP) e a sonda CEN17 marcada com hapteno digoxigenina, estando optimizadas para o sistema de detecção INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail (Ventana, Tucson) e para outros reagentes do mesmo fabricante utilizados neste método.

Após desparafinação numa solução comercial previamente diluída (EZPrep™ 10x, Ventana, Tucson), durante 4 minutos a 72°C, os cortes histológicos foram lavados num tampão de lavagem comercial previamente diluído (Reaction Buffer Concentrate 10X, Ventana, Tucson) e permeabilizados por tratamento pelo calor, seguido de digestão proteica (ISH-Protease 3, Ventana, Tucson), durante 8 minutos a 36°C. O tratamento por calor consistiu em três ciclos, a 86°C, com uma duração de 12 minutos cada ciclo, tendo sido realizado com a solução comercial Cell Conditioning Solution (CC1 Pre-dilute, Ventana, Tucson).

Os cortes histológicos foram incubados com a sonda HER2 DNA, previamente desnaturada a 95°C durante 28 minutos, a uma temperatura de 52°C durante 6 horas. Após o período de hibridação foram efectuadas três lavagens adstringentes (8 minutos cada) a 72°C.

A revelação dos híbridos relativos ao HER2 foi efectuada com o kit UltraView SISH Detection (Ventana, Tucson), segundo o protocolo do fabricante. Resumidamente, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo de coelho anti-DNP conjugado com HRP durante 20 minutos seguido de lavagens no tampão de lavagem comercial e da incubação com o anticorpo de cabra conjugado com HRP anti-coelho. Após duas lavagens com o tampão de lavagem comercial foi efectuada a revelação pela adição sequencial de soluções comerciais, nomeadamente prata A (acetato de Sódio), prata B (hidroquinona) e prata C (peróxido de Hidrogénio) nos cortes histológicos. A formação do precipitado de prata nos locais dos híbridos ocorre por reacções de oxidação redução acopladas, nomeadamente a HRP reduz o peróxido de hidrogénio, ficando com défice de electrões, que são repostos pela quinona que é o produto da reacção da redução do catião prata a prata metálica pela hidroquinona. Deste modo, a HRP pode reduzir mais moléculas de peróxido de hidrogénio.

Posteriormente os cortes histológicos foram incubados com a sonda CEN17 previamente desnaturada a 95°C durante 12 minutos, a uma temperatura de 44°C durante 3 horas. Seguidamente foram realizadas três lavagens de estringência (8 minutos cada) a uma temperatura de 59°C, segundo o protocolo do fabricante. A detecção dos híbridos sonda-região centromérica do cromossoma 17 foi efectuada com o kit UltraView Red ISH Detection (Ventana, Tucson). Resumidamente, os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo de coelho anti-digoxigenina durante 20 minutos seguido de lavagens com o tampão de lavagem comercial e posterior incubação com o anticorpo de cabra conjugado com a fosfatase alcalina anti-coelho. Após duas lavagens com tampão de lavagem comercial, foi realizada a revelação com o cromogénio Fast Red (Ventana, Tucson).

Posteriormente os cortes foram contrastados com Hematoxilina II (Ventana, Tucson), durante 4 minutos. A diferenciação do contraste nuclear foi realizada por uma lavagem na solução Bluing (Ventana, Tucson). Depois de desidratados e diafanizados, os cortes foram montados em meio de montagem sintético, Quick-D (Klinipath, Geel, Belgium). Ao microscópio óptico de campo claro o gene HER2 é visualizado como um ponto preto, enquanto a região centromérica do cromossoma 17 é visualizada por um ponto vermelho, ambos situados no núcleo.

3.5 Avaliação Microscópica

As preparações de IHQ e SISH foram avaliadas segundo as orientações da ASCO/CAP para o estudo de HER2²⁹.

3.5.1 Avaliação dos RE, RP e HER2

Após uma observação microscópica das preparações controlo positivo, para as diferentes imunocolorações para averiguar a qualidade das diferentes imunocolorações, foram seleccionadas as áreas tumorais dos cortes histológicos-caso para avaliação da expressão dos antígenos em estudo. É de salientar que no tecido não tumoral, nomeadamente algumas das células epiteliais dos ductos mamários expressam RE e RP, facto que é utilizado para comprovar a boa execução do método (controlo positivo interno).

Em cada uma das áreas tumorais seleccionadas das imunocolorações para os RE e RP foram contados os núcleos das células tumorais que apresentavam imunorreactividade nítida, assim como todos os núcleos das células tumorais dessas áreas para proceder ao cálculo da percentagem de núcleos marcados para cada um dos receptores. Os resultados finais foram expressos em percentagem, correspondendo o 0% à negatividade e o 100% ao estado positivo para todas as células tumorais. Os valores percentuais encontrados para a imuno-expressão dos RE e RP foram distribuídos, segundo a seguinte escala ordinal: 0- 0% de células tumorais com imuno-expressão; 1- maior que 0 e menor que 50% de células tumorais com imuno-expressão; 2- maior ou igual a 50% de células tumorais com imuno-expressão⁴⁹.

A classificação da avaliação dos resultados de imunohistoquímica para o estudo da expressão da proteína HER2 foi realizada segundo os seguintes critérios (Tabela 7): i) negativo para a expressão da proteína HER2, quando a pontuação atribuída pela IHQ foi de 0 ou 1+, a que corresponde ausência de marcação ou marcação fraca e incompleta da membrana de menos de 10% de células tumorais, respectivamente; ii) equivocada para a expressão da proteína HER2 quando a pontuação atribuída à IHQ foi de 2+, a que corresponde coloração completa de membrana, de padrão não uniforme ou de fraca intensidade distribuída em pelo menos 10% das células tumorais; iii) positivo para a expressão da proteína HER2 quando a pontuação atribuída à IHQ foi de 3+, a que corresponde coloração intensa e completa da membrana celular em mais de 30% das células do tumor invasivo.

Tabela 7. Critérios de classificação da avaliação dos resultados de IHQ para a HER2.

Nível de expressão de HER2	Padrão de coloração da membrana das células do tumor
0 / Negativo	Ausência de marcação
1+ / Negativo	Coloração fraca e incompleta da membrana de menos de 10% das células do tumor
2+ /Fracamente Negativo	Coloração fraca a moderada e completa da membrana de menos de 10% das células do tumor
3+ / Fortemente Positivo	Coloração intensa e completa da membrana celular em mais de 30% das células do tumor

3.5.2 Avaliação do estado do gene HER2

Antes de proceder à avaliação do estado do gene HER2 nas amostras em estudo foi necessário avaliar a qualidade do SISH encontrado nos controlos positivos e nas amostras em estudo, bem como seleccionar as áreas em que se deve proceder à contagem.

Controlo de qualidade das preparações. Resumidamente são descritas as normas mais relevantes e utilizadas para a avaliação do controlo de qualidade. A avaliação da qualidade das sondas e dos reagentes utilizados no SISH foi avaliada por examinação das preparações de linhas celulares que funcionam como controlo positivo. Assim, quando as células presentes no controlo positivo não apresentam uma coloração positiva, as preparações são consideradas inadequadas para avaliação e é repetido o SISH⁴⁴. A influência dos procedimentos laboratoriais, nomeadamente a fixação e processamentos dos tecidos, no SISH foi avaliada pelo corte histológico com diferentes fragmentos previamente classificados quanto ao estado do gene HER2 e que foram fixados e processados segundo os protocolos do Serviço. Adicionalmente, como as sequências de HER2 e de CEN17 estão presentes em duplicado em cada célula do corpo humano, as células normais (fibroblastos do estroma, células endoteliais, linfócitos e outras células não neoplásicas) presentes na área alvo do carcinoma ou ao seu redor, funcionam como controlo positivo interno. Deste modo, a visualização de um a dois pontos discretos pretos (HER2) e um a dois pontos discretos vermelhos (região centromérica do cromossoma 17) no núcleo das células normais são dados indicativos de que a fixação e o processamento dos tecidos foram realizados de forma satisfatória. No caso de se observar uma coloração não específica nos núcleos das células do tecido normal ou do controlo positivo de tecido, traduzida por coloração difusa dos núcleos (indicativo de ocorrência de reacções não desejadas entre os reagentes imunológicos e os componentes celulares ou do tecido) os resultados obtidos para as amostras em estudo não são validados.

Para proceder à contagem dos pontos nucleares, foram excluídas as áreas de necrose, as áreas com sobreposição de núcleos ou com compressão do tecido, assim como os núcleos anormais, gigantes e pequenos⁴⁴. Nas áreas seleccionadas foram contados os pontos discretos presentes nos núcleos das células tumorais com bom detalhe de marcação e sem sobreposição de núcleos e que representam a generalidade da população celular da neoplasia invasiva.

Quando foi observada heterogeneidade no número de cópias do gene HER2 na população de células tumorais de uma dada área ou de áreas distintas, foram seleccionados os núcleos com maior número de sinais para a contagem⁴⁴.

Avaliação e classificação do estado do gene HER2. As preparações de SISH foram avaliadas segundo as orientações da ASCO/CAP²⁹.

Os sinais de marcação SISH visualizados (anexo 1) correspondem a cópia única, cópias múltiplas ou agrupamentos. A cópia única é visualizada por um sinal discreto preto ou vermelho e é considerado como uma cópia única do HER2 ou CEN17, respectivamente. Para o sinal preto, sinais únicos discretos visualizados nos núcleos do controlo interno representam o tamanho de uma cópia única nas células de carcinoma invasivo. Para os sinais vermelhos, cada sinal discreto é considerado como uma cópia.

As cópias múltiplas são visualizadas como sinais únicos discretos pretos nos núcleos das células de carcinoma invasivo, sendo o tamanho destes sinais superior ao tamanho dos pontos discretos pretos encontrados nos núcleos das células que funcionam como controlo positivo interno. Assim, o tamanho dos sinais únicos SISH do controlo positivo interno é utilizado como uma referência para determinar o número relativo de cópias amplificadas nos núcleos de cancro. Para os sinais vermelhos, cada sinal discreto é considerado como uma cópia.

Um agrupamento é definido como a sobreposição de vários sinais pretos nos núcleos, que não são distinguidos individualmente. São contados por estimativa tendo como referência os sinais isolados do controlo interno. Por exemplo, um grande agrupamento de sinais pretos múltiplos pode ser estimado como 12 cópias do gene HER 2, enquanto os agrupamentos mais pequenos podem ser estimados como 6 cópias desse gene. A presença de agrupamentos do gene HER2 é anotada na folha de pontuação (anexo 2).

No presente estudo foram avaliados 20 núcleos tendo sido contado o número de sinais vermelhos (CEN17) e sinais pretos (HER2) encontrado em cada núcleo. Nos casos classificados como amplificação equívoca pela imunohistoquímica para o HER2 foram avaliados 20 núcleos adicionais.

O estado do gene HER2 foi determinado tendo em consideração o valor obtido na razão entre o somatório dos pontos discretos pretos (HER2) e o somatório dos pontos vermelhos (CEN17) no total de núcleos contados (20 ou 40). Assim, quando a razão: i) é inferior a 1,4, é considerado que não houve amplificação do gene HER2; ii) se situa entre 1,8 e 2,2 é considerado amplificação equívoca; iii) é superior a 4,0, é considerado que houve amplificação do gene HER2.

Nos casos que foram considerados como não havendo amplificação do gene HER2 após a contagem dos sinais em 20 núcleos (amostras em que foram observados 4-6 pontos em mais de 50 % das células de carcinoma no campo-alvo seleccionado, na pequena ampliação), procedeu-se à contagem em mais 20 células tumorais. Nos casos em que persistiram dúvidas, foi repetido o SISH num outro corte de tecido tumoral da amostra em questão.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente no software Statistical Package for the Social Scienses (SPSS) para o Windows® versão 17.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Com o objectivo de sumariar e analisar os resultados obtidos foram calculadas as frequências absolutas e as frequências relativas dos dados clínico-patológicos das pacientes e respectivo diagnóstico anátomo-patológico, assim como dos casos relativamente à imuno-expressão encontrada para os RE, RP e HER2 e ao estado do gene HER2. O valor médio e o respectivo desvio padrão relativo à percentagem de células tumorais encontradas com imuno-expressão para os RE e RP foi calculado para os valores 1 e 2 da escala ordinal aplicada.

De forma a averiguar a validade do método SISH relativamente ao método FISH foi estimada a concordância para a percentagem dos valores positivos, a concordância para a percentagem dos valores negativos e a concordância no global com os respectivos intervalos de confiança para um nível de confiança de 95%.

O teste de McNemar para amostras emparelhadas com variáveis nominais foi realizado para averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos pelos métodos FISH e SISH. Os resultados obtidos pelos dois métodos SISH foram considerados semelhantes para um nível de significância (α) de 0,05 quando $p \geq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização da população

A população de pacientes em estudo apresentava uma idade média de 58 anos, sendo a idade máxima de 96 e a mínima de 36 anos. As amostras em estudo foram obtidas por biopsia incisional (15), biopsia excisional (14) e de peças de mastectomia (40). A dimensão média dos tumores encontrados foi de 2,46 cm, salientando-se que em 27 casos o maior diâmetro do tumor foi menos de 2 cm. Das 40 peças cirúrgicas com esvaziamento ganglionar axilar, 27 casos (67,5%) não apresentaram metastização ganglionar e em 13 casos (32,5%) foram registados gânglios metastizados, tendo 2 casos (5%) apresentado 1 gânglio metastizado, 1 caso (2,5%) 3 gânglios metastizados e os restantes 10 casos (25%) com 4 ou mais gânglios metastizados. Outras características clínico-patológicas da população em estudo são encontradas na Tabela 8.

Tabela 8. Características clínico-patológicas da população em estudo (N=69).

Pacientes	Características
Sexo	Feminino
Idade, anos média (amplitude)	58 (36 – 96)
Tamanho do tumor, cm média (amplitude)	2,46 (0,3 – 8)
Estadio, N (%)	
0	2 (2,90)
I	7 (10,14)
II	24 (34,78)
III	16 (23,19)
IV	4 (5,80)
Não determinado	16 (23,19)
Metastização ganglionar, N (%)	13 (18,84)
Não determinado, N (%)	29 (42,03)
Invasão vascular, N (%)	10 (14,49)
Não determinado	46 (66,67)

O diagnóstico anátomo-patológico revelou que a maioria dos casos era carcinoma ductal invasor (n=60, 86,95%), dois casos de carcinoma ductal in situ, quatro casos de carcinoma lobular invasor, dois casos de recidiva cutânea de carcinoma ductal invasor e um caso de carcinoma ductal invasor metaplásico (Tabela 9).

Tabela 9. Caracterização histopatológica da população de pacientes em estudo (N=69).

Diagnóstico Histológico	Frequência (N)	Porcentagem (%)
Recidiva de carcinoma ductal invasor	2	2,90
Carcinoma lobular invasor	4	5,80
Carcinoma ductal invasor papilar	3	4,35
Carcinoma ductal invasor metaplásico	1	1,45
Carcinoma ductal invasor		
Grau 1	5	7,25
Grau 2	21	30,43
Grau 3	16	23,19
Biopsia carcinoma ductal invasor	15	21,74
Carcinoma ductal in situ	2	2,90
Total	69	100,00

4.2 Avaliação da expressão dos RE e RP

A avaliação da expressão dos receptores de estrogénio (RE) e dos receptores de progesterona (RP) é realizada por rotina no laboratório de Anatomia Patológica, por imunohistoquímica, uma vez que o seu estudo é essencial para direccionar a terapia. Ambos os receptores são expressos ao nível do núcleo das células neoplásicas, sendo visualizados, pela técnica de imunohistoquímica, por uma coloração acastanhada nuclear.

As imunocolorações realizadas para ambos os receptores apresentaram apenas marcação nuclear, não se tendo obtido marcação em qualquer outro compartimento celular, ou mesmo ao nível intercelular, resultado indicativo de que não se obteve marcações inespecíficas (Figura 4).

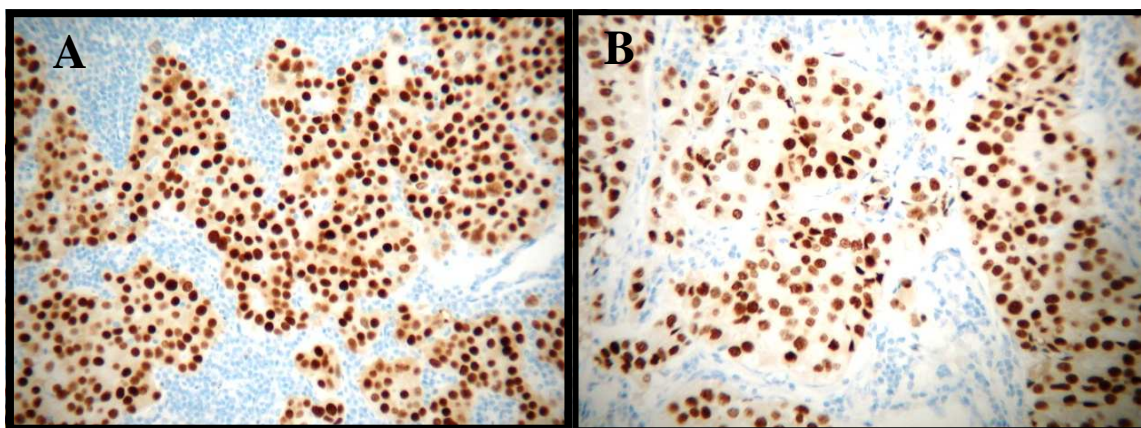


Figura 4. Imuno-expressão dos receptores de estrogénio (A) e dos receptores de progesterona (B) em cancro mamário fixado em formol a 10% tamponado. Ampliação 200x.

No presente estudo, 42 dos 69 casos (60,87%) mostraram imuno-expressão para RE e 43 casos (62,32%) mostraram imuno-expressão para RP (Figura 5). É de salientar que 50,72% dos casos apresentaram imuno-expressão para ambos os receptores e que 27,54% dos casos

são negativos quer para a expressão de RE quer de RP, conforme se pode verificar no gráfico da Figura 5.

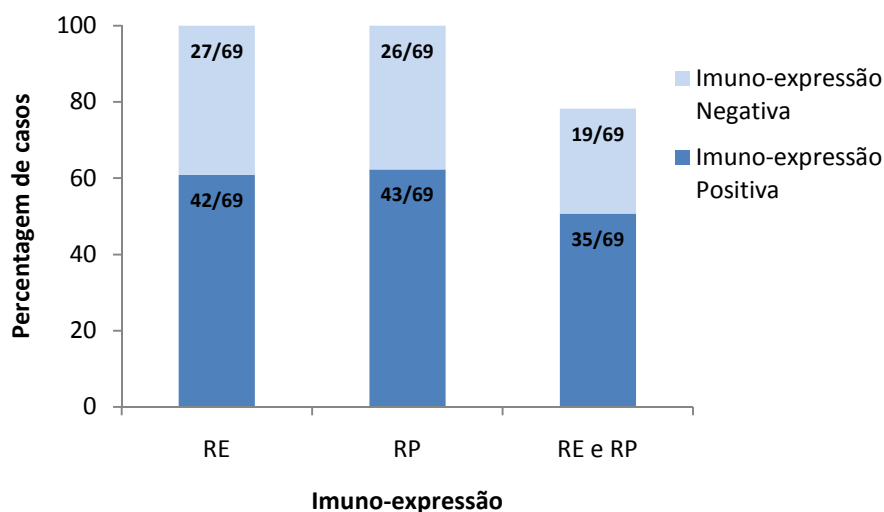


Figura 5. Representação gráfica dos casos em estudo relativamente à expressão RE e RP

Como referido anteriormente (introdução), globalmente, os tumores que expressam RE e RP respondem bem à terapia anti-estrogénica. Contudo, é recomendado avaliar a percentagem de células tumorais que apresentam imunorreatividade para estes biomarcadores, uma vez que a resposta ao tratamento anti-estrogénico varia com a percentagem de células positivas para os RE ou para os RP encontradas no corte histológico. A percentagem de células tumorais positivas para os RE ou para os RP foi calculada através da razão do número de células neoplásicas com imuno-expressão para os referidos receptores e o número total de células neoplásicas encontradas na totalidade do corte histológico.

Tabela 10. Distribuição dos casos segundo a percentagem de células com imuno-expressão encontrada para os receptores de estrogénio (RE) e para os receptores de progesterona (RP).

Escala	Casos, N (%)	
	RE	RP
0	27 (39,13)	26 (37,68)
1	8 (11,59)	12 (17,39)
2	34 (49,28)	31 (44,93)
Total	69 (100,00)	69 (100,00)

Escala: 0- 0% de células tumorais com imuno-expressão; 1- maior que 0 e menor que 50% de células tumorais com imuno-expressão; 2- maior ou igual a 50% de células tumorais com imuno-expressão.

Da análise da Tabela 10 podemos constatar que 49,28% dos casos em estudo apresentou mais de 50% das células neoplásicas com imuno-expressão para os RE, sendo o valor médio de $82,36 \pm 15,16\%$ de células neoplásicas positivas para RE. No que concerne à

imuno-expressão para os RP verifica-se que 44,93% dos casos apresentaram imuno-expressão, sendo o valor médio da percentagem de células neoplásicas positivas para RP de $82,10 \pm 15,85\%$. A frequência relativa dos casos em que não foi observada imuno-expressão para os RE ou RP é considerável, sendo de 39,13% e 37,68%, respectivamente. É de salientar que o número de casos com uma percentagem de células positivas para RE ou RP inferior a 50 % é baixo (11,59% e 17,39%) comparativamente ao das outras duas classes, sendo o valor médio da percentagem de células encontradas positivas de $21,88 \pm 15,16\%$ e $25,82 \pm 13,51\%$, respectivamente.

4.3 Avaliação da expressão da proteína HER2

A avaliação da expressão da proteína membrana HER2 é realizada por rotina nos casos diagnosticados com carcinoma invasivo. No laboratório de Anatomia Patológica a sua expressão é realizada por imunohistoquímica, aparecendo a membrana celular das células em que esta é expressa com uma cor acastanhada.

As imunocolorações realizadas apresentaram apenas marcação na membrana celular de algumas células tumorais, não se tendo obtido marcação em qualquer outro compartimento celular, ou mesmo ao nível intercelular, resultado indicativo que não se verificou marcação inespecífica (Figura 6).

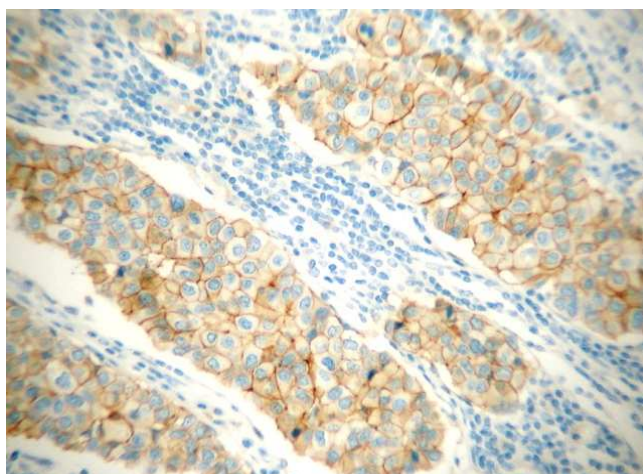


Figura 6. Corte de tecido mamário com neoplasia invasiva com imuno-expressão de HER2 em área de tumor invasivo. Ampliação de 200x.

De todos os casos, nove (13,04%) não apresentaram imuno-expressão (ausência de marcação). Os restantes casos apresentaram imuno-expressão tendo sido esta variável, quer na presença de marcação por toda a membrana celular, quer na intensidade da imunocoloração, bem como na percentagem de células tumorais com imuno-expressão (Figura 7 A-D).

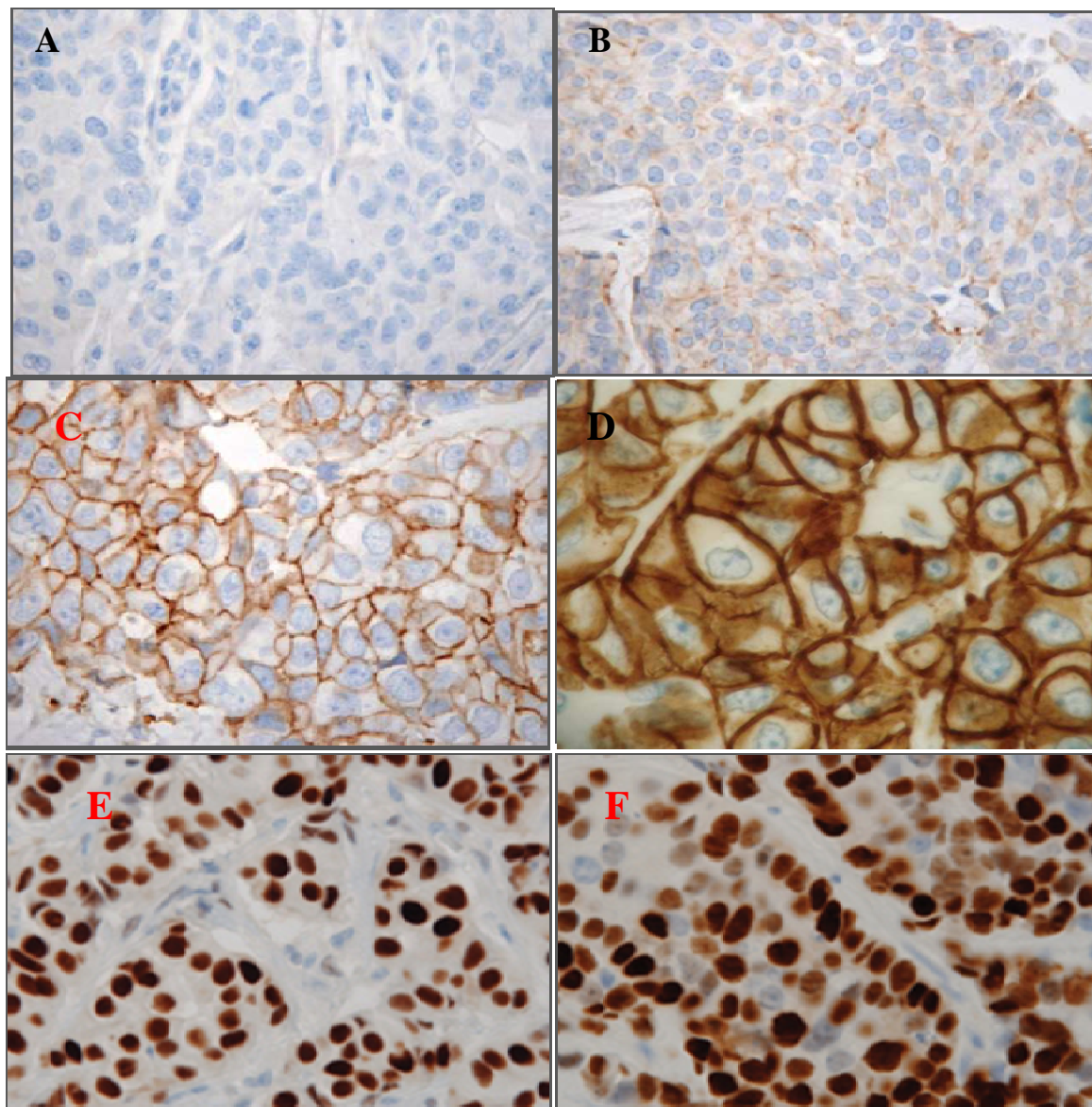


Figura 7. Resultados de IHQ para avaliação da expressão de HER2 e receptores hormonais em tecido mamário, ampliação 200x. **A** – caso negativo, HER2 0; **B** - caso negativo, HER2 1+; **C** - caso equívoco, HER2 2+; **D** – caso positivo, HER2 3+; **E** – expressão de RE (90%); **F** – expressão de RP (100%).

Assim, os casos foram avaliados microscopicamente e classificados segundo as directrizes de ASCO/CAP, para averiguar os casos quanto à sobre-expressão do HER2 (positivos, equívocos e negativos). Os resultados obtidos estão agrupados, de forma resumida, na Tabela 11.

Tabela 11. Frequências absolutas e relativas quanto à imuno-expressão da HER2, segundo as directrizes da ASCO/CAP.

Escala	Casos N (%)	Sobre-expressão da proteína HER2
0	9 (13,04)	Negativa
1	7 (10,14)	
2	34 (49,28)	Equívoca
3	19 (27,54)	Positiva
Total	69 (100,00)	

Os dados dos resultados da avaliação da expressão da proteína HER2 por IHQ constam da Tabela 11. Da sua análise constata-se que 27,54% dos casos apresentaram sobre-expressão da proteína HER2 que poderá corresponder apenas a uma sobre-expressão ou a uma sobre-expressão e amplificação do gene HER2. Estes casos poderão beneficiar com uma terapia com (Herceptin®, Genetech, San Francisco), contrariamente aos casos que são considerados negativos para a sobre-expressão (23,19%). A maioria dos casos foi considerada equívoca quanto à sobre-expressão (49,28%), sendo necessário avaliar o estado do gene HER2 por HIS. Dezasseis casos foram negativos para a sobre-expressão da proteína, sendo nove classificadas com 0 e sete como 1+.

4.4 Avaliação do estado do gene HER2

A avaliação da amplificação do gene HER2 é realizada por rotina nos casos diagnosticados com carcinoma invasivo que tenham sido considerados equívocos pelo estudo imunohistoquímico, nomeadamente nos casos com uma pontuação de dois. Assim, a avaliação por FISH não foi realizada em todos os casos do presente estudo, isto é, não foi efectuada em alguns dos casos em que foi atribuída a pontuação 3, que corresponde àqueles em que se observou uma sobre-expressão da HER2 por IHQ. Deste modo, a amostra para realização do FISH foi diminuída para 62 casos. A metodologia FISH foi realizada num laboratório externo de referência em cortes histológicos obtidos a partir dos blocos seleccionados para o presente estudo, estando os resultados registados na Tabela 12.

O método SISH foi realizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Pedro Hispano e foi efectuada em todos os casos com o intuito de relacionar os resultados obtidos por imunohistoquímica com os obtidos pelo SISH. Por observação da Figura 8 verifica-se que pelo método SISH realizado (dupla marcação) foi possível visualizar na mesma preparação histológica os sinais relativos aos híbridos para o gene HER2, com uma cor negra, e os sinais relativos aos híbridos para a região centromérica do cromossoma 17, com uma cor vermelha, que funciona como um controlo de referência. Estes sinais aparecem quer nos núcleos das células normais quer nas células tumorais (Figura 8). A existência da dupla marcação nas células normais foi indicativa de que o método foi bem executado (Figura 8). Pontualmente são observados alguns sinais deslocados do núcleo os quais não foram valorizados. Para a realização da contagem dos sinais nucleares obtidos pelo SISH foram seleccionadas áreas de tumor invasivo, não se

procedendo à contagem dos sinais presentes em núcleos de células não tumorais, bem como dos sinais pouco intensos, pouco nítidos e/ou não correctamente posicionados nos núcleos das células tumorais.

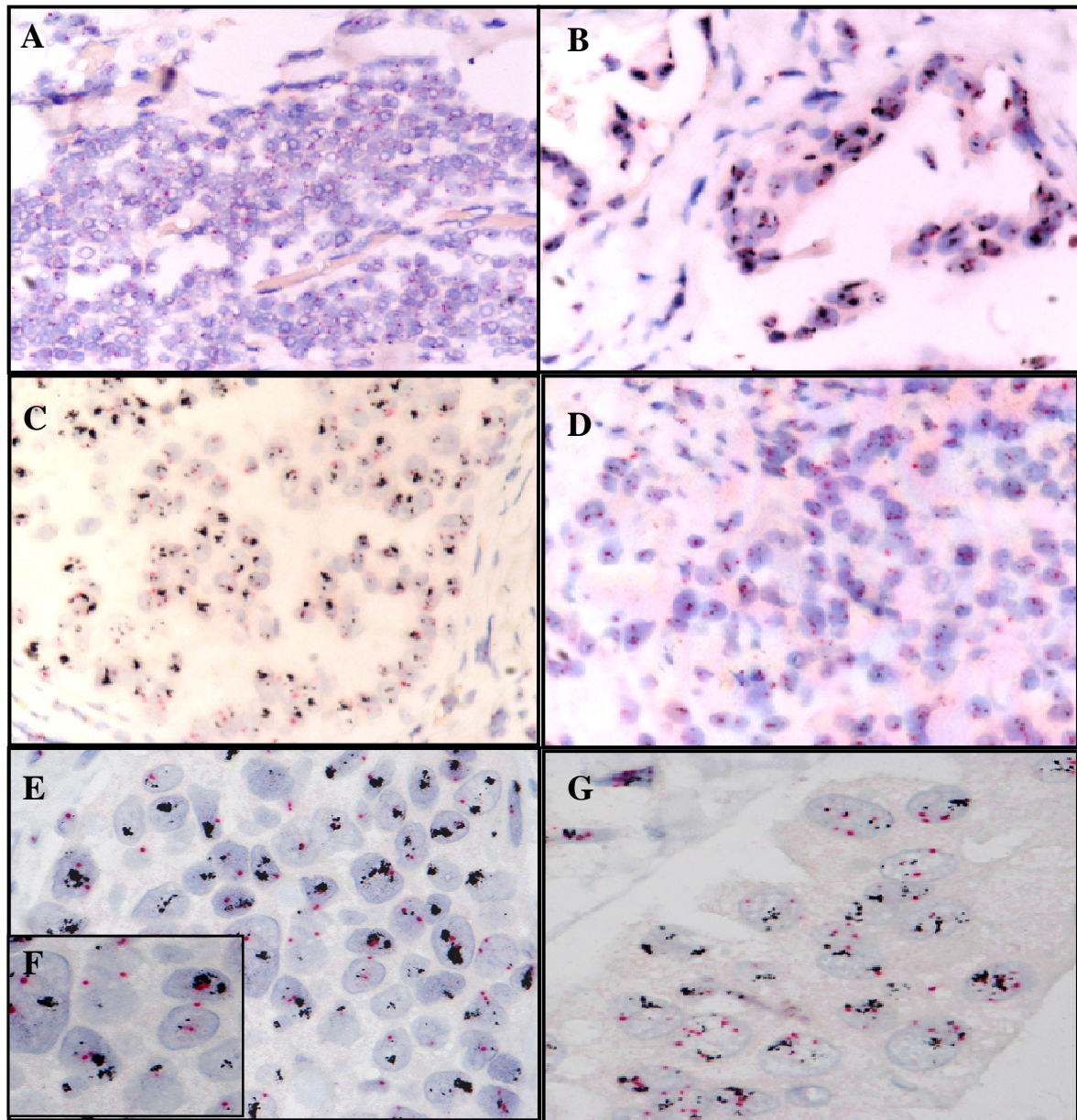


Figura 8. Resultados de SISH para avaliação do estado de amplificação do gene HER2 em tecido mamário. A preto a marcação do gene HER2; A vermelho a marcação do CEN17. **A** - Artefacto “Nuclear Bubbling”; **B** - Caso sem amplificação; **C** - Caso com amplificação; **D** - Caso sem amplificação; **E** - Caso com amplificação com heterogeneidade tumoral, **F** – Pormenor de **E** onde se pode ver núcleos sem amplificação e outros com amplificação; **G** - Caso sem amplificação com polissomia CR17. (Ampliação: **A-D** 200x; **E-G**:400x).

A boa morfologia dos tecidos permitiu escolher com facilidade as áreas de tumor invasivo a avaliar, bem como evitar a contagem de núcleos sobrepostos. De realçar que foram raras as imagens microscópicas com marcação de fundo e que nos poucos casos em que

apareceu, não invalidou uma correcta avaliação dos sinais de marcação. A contagem foi efectuada por dois observadores independentes, tendo ocorrido discrepâncias na classificação de alguns casos. Esses casos foram revistos, tendo-se chegado a uma classificação similar para cada caso.

Aquando da classificação dos casos em com ou sem amplificação para o gene HER2, verificou-se que 34 amostras não pertenciam a uma destas categorias. Estes casos apresentavam um número médio entre 4 a 6 pontos na pequena ampliação em mais de 50 % das células de carcinoma no campo alvo seleccionado. Assim, foi necessário proceder à contagem de sinais em mais 20 núcleos de células tumorais, perfazendo um total de 40 células avaliadas. Destes 34 casos, ainda persistiram dúvidas na classificação nominal de quatro casos, tendo sido necessário realizar novamente o método SISH num corte histológico obtido de um outro bloco representativo da lesão de cada um desses casos.

Por observação da Tabela 12 é possível verificar que a percentagem de casos com amplificação ou sem amplificação do gene HER2 foi similar por ambos os métodos de ISH. Contudo, pelo método FISH cinco casos foram classificados como inconclusivos, tendo sido classificados como sem amplificação pelo método SISH. É de salientar, dois destes casos pertencem aos casos em que foi necessário repetir o SISH num corte histológico de um outro bloco com fragmento representativo da lesão. Estes cinco casos classificados como inconclusivos por FISH foram classificados quanto à imuno-expressão da HER2 como equívocos (três casos) e negativos (dois casos), tendo-lhes sido atribuída a pontuação de 2 (três casos) e 1 (dois casos), respectivamente.

Tabela 12. Distribuição dos resultados relativos ao estado de amplificação do gene HER2, pelos métodos SISH e FISH.

HIS	% Células com imuno-expressão N			Total
	Sem Amplificação	Inconclusivos	Com Amplificação	
SISH	53 (76,81)	0 (0,00)	16 (23,19)	69 (100)
FISH	44 (70,97)	5 (8,06)	13 (20,97)	62 (100)

Nos sete casos em que não foi efectuado o método FISH, o resultado pelo método SISH foi de não amplificado, embora todos estes casos tenham uma pontuação 3 por imunohistoquímica para o HER2. Por este motivo, as preparações de imunohistoquímica para o HER2 relativas a estes casos foram reavaliadas, tendo-se obtido os resultados iniciais.

Dos 44 casos sem amplificação do gene HER2 pelo método FISH, três casos (6,82%) foram positivos pelo SISH. Destes três casos um foi considerado com sobre-expressão para a HER2, por imunohistoquímica, enquanto os outros dois casos foram considerados inconclusivos na avaliação da sobre-expressão da HER2 (2+), resultado que sugere que o método SISH seja muito sensível.

É de salientar o facto de não se ter registado casos classificados como equívocos na avaliação efectuada por SISH.

A concordância obtida para a percentagem de casos positivos pelo SISH *versus* o método FISH foi de 100% (Tabela 13). Na verdade, todos os casos classificados com

amplificação do gene HER2 por SISH foram classificados também como amplificados pelo método FISH (13 casos). O valor estimado para a concordância da percentagem dos casos negativos foi de 93,18 % sendo o intervalo de confiança para 95% muito estreito. Na globalidade, foi obtida um valor estimado para a concordância entre os dois métodos elevada (94,74%) (Tabela 13).

Tabela 13. Dados dos cálculos do nível de concordância e respectivos intervalos de confiança entre as metodologias FISH e SISH, na amostra estudada.

Estimativa da Concordância		
Percentagem de valores positivos (IC 95%)	Percentagem de valores negativos (IC 95%)	Global (IC 95%)
100 (100-77,19)	93,18 (97,65-81,77)	94,74 (98,21-85,64)

O valor de p obtido pelo teste de McNemar para um nível de significância de 0,05 foi de 0,250, o que mostra que os resultados obtidos por ambos os métodos não são significativamente diferentes

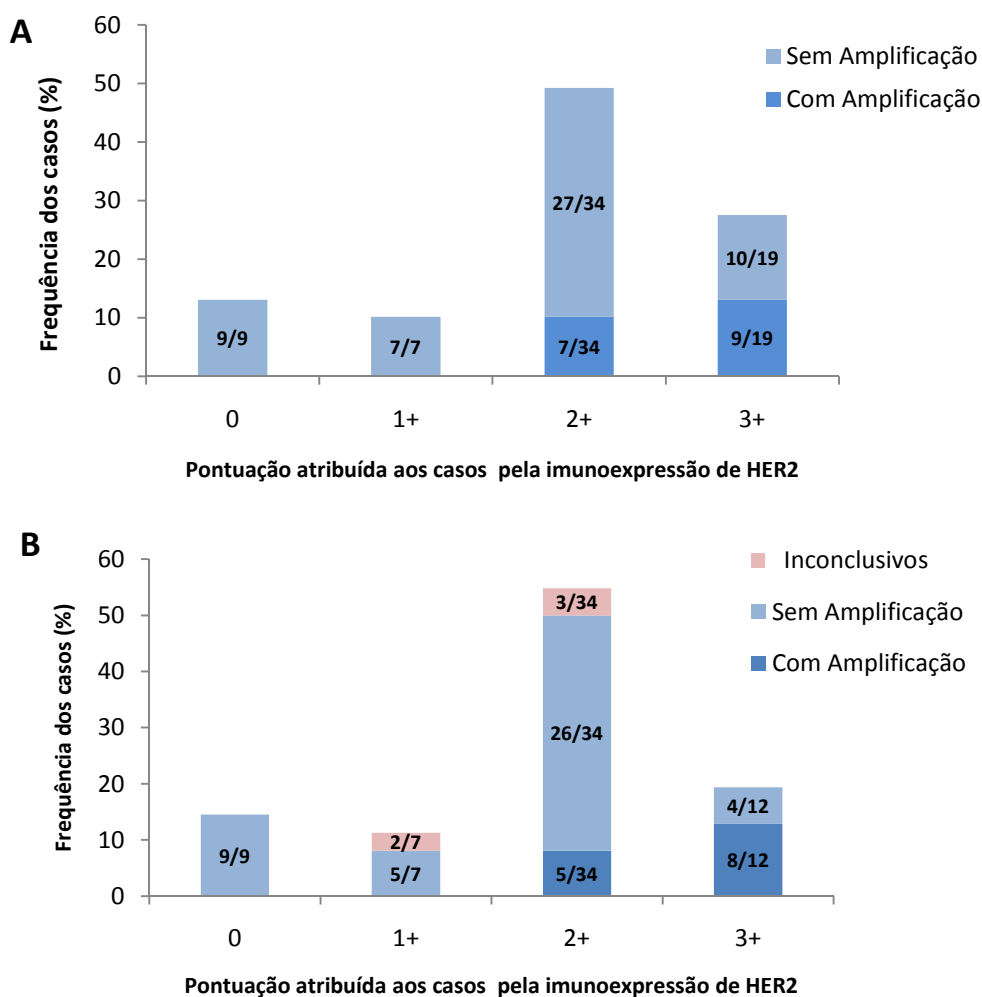


Figura 9. Distribuição dos casos avaliados para a imuno-expressão da HER2 segundo o estado de amplificação do gene HER2 pelo método SISH (A) e pelo FISH (B).

Comparando os resultados obtidos para a sobre-expressão da HER2, por imunohistoquímica, com os obtidos para a amplificação do gene HER2 verifica-se que todos os casos negativos para a sobre-expressão de HER2 (casos com pontuação 0 e 1+) não apresentam amplificação do gene HER2 quer pelo método SISH (Figura 9A) quer pelo método FISH (Figura 9B). Relativamente aos casos que mostraram sobre-expressão da HER2 (pontuação 3+) aproximadamente 52% dos casos não apresentam amplificação pelo método SISH (Figura 9A) e 33,3% dos casos não apresentam amplificação pelo método FISH (Figura 9B). É de salientar que os casos em que não foi avaliada a sobre-expressão por FISH apresentavam sobre-expressão de HER 2 por imunohistoquímica e que foram negativos para a amplificação do gene pelo método SISH. Dos 34 casos tidos como equívocos para a sobre-expressão da HER2 por IHQ (2+) apenas 20,59% dos casos revelaram amplificação do gene HER2 pelo método SISH (Figura 9A) e 14,71% dos casos revelaram amplificação do gene HER2 pelo método FISH (Figura 9B).

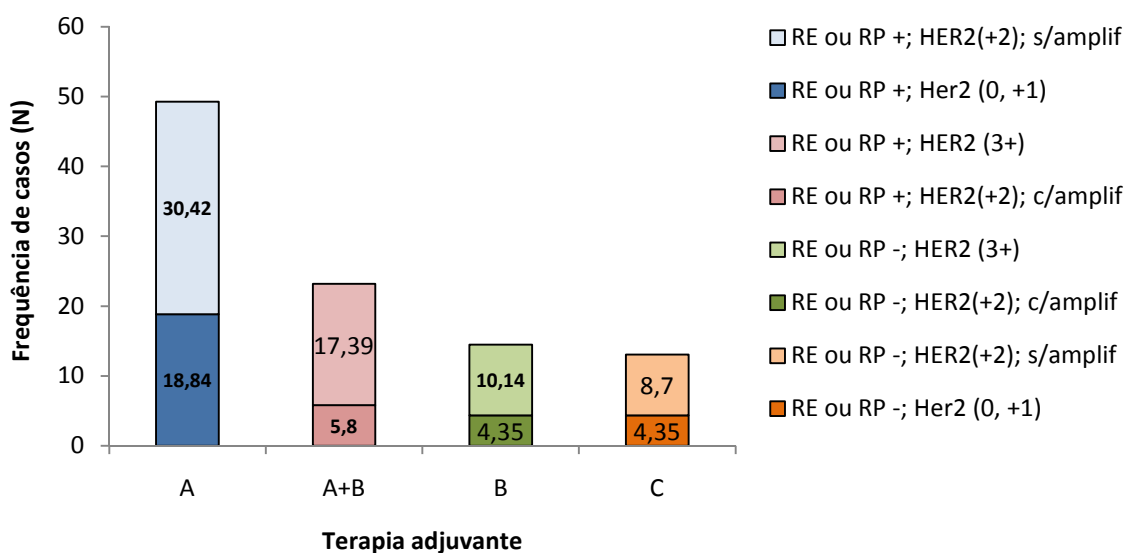


Figura 10. Distribuição dos casos segundo o benefício no tratamento por aplicação de terapia adjuvante. **A-** terapia com anti-estrogénicos; **B-** terapia com inibidores da sinalização do HER2; **C-** sem terapia adjuvante.

Tendo em consideração os resultados obtidos para a imuno-expressão dos RE, RP e da HER2, e da amplificação do gene HER2 pelo método de FISH é possível averiguar a percentagem de pacientes que poderão beneficiar no tratamento por aplicação de terapia adjuvante, para bloqueio dos receptores ou da sinalização intracelular emitida por estes, (Figura 10). Assim, é possível verificar que na presente amostra apenas 13,05% das pacientes não beneficiam de terapia hormonal adjuvante (3 casos triplo negativos para RE, RP e HER 2) e que 14,49% destas pacientes apresentam a sobre-expressão da proteína HER2 e amplificação do respectivo gene, podendo deste modo beneficiar de terapia via HER2. Adicionalmente, verifica-se que 32% das pacientes com tumores que expressam RE e/ou RP beneficiam, além da terapia anti-estrogénica também da terapia à base de inibidores da sinalização da HER2 (Figura 10).

5. Discussão

A avaliação exacta do estado do gene HER2 e do seu produto proteico são ferramentas importantes para o clínico tomar decisões terapêuticas, nomeadamente identificar o grupo de pacientes com carcinoma da mama que pode beneficiar da terapia com trastuzumab (Herceptin®, Genetech, San Francisco)³³. Estas ferramentas preditivas da terapêutica são fornecidas pelos Serviços de Anatomia Patológica.

O método considerado *gold standard* para a avaliação do estado do gene HER2 é o FISH²⁹. Contudo esta metodologia não está acessível a todos os laboratórios que se propõem efectuar essa avaliação preditiva terapêutica devido à necessidade de equipamentos e pessoal especializado para a análise, entre outros. O FISH é um método moroso, facto que leva a um dispêndio de tempo em tarefas manuais na maioria dos laboratórios. Para a avaliação dos resultados obtidos pelo FISH é necessário um microscópio de fluorescência em sala escura. Os sinais de marcação, por serem fluorescentes, decaem rapidamente quando expostos à luz, sendo necessário câmaras digitais sensíveis para a gravação dos principais campos^{33 50}. Não menos importante, o método FISH pode originar resultados falso positivos quando a avaliação/análise é realizada por pessoal não especializado, devido a não ser possível reconhecer a morfologia do tecido ao microscópio de fluorescência aquando da contagem dos sinais de marcação. Os resultados falso negativos, originados por este método, são raros, podendo ocorrer quando são seleccionadas áreas heterogêneas do tumor para a avaliação¹¹. Esta situação é resolvida pela observação paralela de um corte seriado corado pela HE que permite a selecção da área de tumor a avaliar.

Estas condicionantes impulsionaram o desenvolvimento de outros métodos laboratoriais que se adaptam melhor à rotina do laboratório de Anatomia Patológica.

Uma das formas mais utilizadas para avaliar o estado do HER2, é saber o grau de expressão da proteína HER2, que é efectuada por IHQ nos laboratórios de Anatomia Patológica. A IHQ é um dos métodos mais rápidos, mais barato, com taxa de sucesso geralmente alto, fornece resultados com uma coloração que não decai com o tempo e observável ao microscópio de campo claro, sendo possível observar simultaneamente a morfologia do tecido. Tem no entanto as desvantagens da avaliação/análise estar sujeita à susceptibilidade e variabilidade inter-observadores, pelo que requer validação e normalização⁵⁰. A marcação de HER2 no epitélio mamário não neoplásico pode ocorrer e não deve ser confundida com a marcação nas células tumorais. O epitélio não tumoral da mama expressa o gene HER 2 que pode produzir sinais 1+ ou mesmo 2+, dependendo das condições de fixação e/ou processamento e, se ignorados, pode ocorrer um número significativo de falso positivos²⁹. A FISH é mais objectiva e quantitativa do que a IHQ. A reprodutibilidade dos resultados depende de cortes finos e do reconhecimento e interpretação do componente invasivo da neoplasia, o que por vezes não é fácil de obter. O ácido deoxirribonucleico (ADN) é mais estável do que a proteína, e os factores pré-analíticos têm menor impacto no resultado do teste p0r HIS do que a análise por IHQ⁵⁰. Por estes motivos, a imunohistoquímica é o método mais comumente utilizado como primeiro *screening* do estado do HER2, e os casos equívocos são sujeitos a

avaliação pelo método FISH para determinação do estado de amplificação do gene, dado pelo rácio HER2/CEN17³³.

Alguns estudos mostram uma grande discordância entre os resultados dos métodos de IHQ e da FISH entre os laboratórios locais, centrais ou de referência para o estudo de HER2, sendo reconhecida a necessidade da standardização das metodologias pré-analíticas e analíticas nos diferentes laboratórios de forma às respostas solicitadas irem de encontro à melhoria dos cuidados personalizados aos doentes com carcinoma da mama^{10; 33}.

A ASCO/CAP emitiu as recomendações para o estudo do gene HER2 nos carcinomas da mama em 2007, das quais se salientam dois passos importantes para a standardização das metodologias, que incluem a automatização do processamento das amostras, a leitura das lâminas, bem como a concentração do estudo dos casos em laboratórios com patologistas mais experientes, ou seja com mais testes realizados^{10; 33}.

A IHQ para HER2 é facilmente realizada nas plataformas automatizadas já existentes nos laboratórios de anatomia patológica. Actualmente já é possível utilizar algumas destas plataformas para as metodologias HIS. O seu desempenho pode ser bastante melhorado com a aquisição de sistemas de imagem que eliminam a subjectividade na interpretação dos resultados obtidos por IHQ. Os sistemas automáticos de análise de imagem não estão ainda disponíveis em todos os laboratórios de Anatomia Patológica mas começam a ser utilizados e tendem a ser de uso generalizado.

As orientações de ASCO/CAP referem que certos factores pré-analíticos são importantes a ponto de excluir as amostras na avaliação do estado de HER2. Destes factores, salientam-se o uso de outros fixadores que não o formol tamponado; *core* biopsias com um tempo de fixação em formol inferior a uma hora; peças excisionais com um tempo de fixação inferior a 6 horas; e peças com um tempo de fixação superior a 48 horas²⁹. Estes factores, o tipo e tempo de fixação, são de difícil controlo laboratorial, sendo necessário envolver os outros sectores da clínica hospitalar no sentido da sua resolução, nomeadamente os profissionais do bloco operatório. Adicionalmente, o tempo decorrido entre a colheita e a fixação da peça cirúrgica pode influenciar os resultados das técnicas de hibridação, segundo estudos publicados por Thaer Khoury *et al*, não sendo tão notórios no método de IHQ⁵¹.

Outros critérios de avaliação estabelecidos e mais restritivos são: realizar a classificação 3+ por IHQ quando houver mais de 30% das células neoplásicas com intensidade forte; introdução do termo equívoco para classificar os casos de HER2 com pontuação 2+ por IHQ; e/ou rácio HER2/CEN17 entre 1,8 e 2,2 por HIS^{10; 27; 29}. Estes novos critérios foram aplicados nas avaliações das amostras do presente estudo.

No entanto é também referido que os resultados dos laboratórios centrais poderão não ser os mais correctos, uma vez que não controlam os requisitos pré-analíticos, podem receber amostras inapropriadas, nomeadamente blocos ou cortes histológicos sujeitos a factores que podem levar a uma diminuição do sinal de marcação para a HER2¹¹.

Assim, foi lançado o repto do compromisso dos laboratórios efectuarem contra análises com outra metodologia e que obtenham 95% de concordância entre métodos para os casos positivos e os casos negativos^{10; 29}. Segundo ASCO/CAP todos os laboratórios de IHQ devem validar os seus métodos obtendo menos de 5% de discordância nas amostras classificadas como positivas ou como negativas com um método e/ou laboratório validado²⁹. Se o laboratório não

consegue cumprir aquele critério deve enviar os casos para um laboratório referenciado. Os casos equívocos (2+ por IHQ) não carecem de concordância e devem ser testados segundo outra metodologia, nomeadamente HIS^{27; 29}.

Estudos clínicos mostraram resultados semelhantes para a sobre-expressão da proteína HER2 por IHQ e por amplificação do gene HER2^{40; 42}, o que mostra que independentemente do método de avaliação que se utilize para estudar o estado do HER2 estes têm de ser precisos e de grande sensibilidade. No presente estudo não foi realizada uma outra metodologia para avaliação da proteína HER2 para validar o método de imunohistoquímica. Contudo, foi constatado que todos os casos classificados como negativos por imunohistoquímica (pontuação 0 e 1) foram negativos para amplificação do gene HER2 pelo método SISH, o que mostra uma concordância total nas amostras classificadas como negativas. Relativamente aos casos que mostraram uma sobre-expressão da HER2 por imunohistoquímica, apenas cerca de 50% é que mostraram amplificação do gene HER2 pelo método SISH. Tendo em consideração o resultados obtidos apenas pelo SISH e os descritos na literatura²⁵ poder-se-ia supor que se está em presença de resultados falsos negativos. Contudo, a percentagem de casos com amplificação pelo método de *golden Standard* (FISH) e com sobre-expressão da proteína HER 2 foi de 66,6% e todos estes casos também mostraram amplificação pelo método SISH. As razões para estas discrepâncias com a literatura²⁵ poderão ser devido à natureza subjectiva da interpretação de IHQ, incapacidade de se distinguir a sobre-expressão da proteína por amplificação do gene HER2 ou por ocorrência de polissomia do CR17. Dos 24 casos classificados por IHQ como equívocos (pontuação 2+), 79,41% foram tidos como não amplificados pelo SISH, resultado que vai de encontro ao descrito na literatura que aponta para uma taxa entre 64 e 95% dependendo do critério utilizado⁵⁰.

A metodologia SISH quando realizada em modo dupla marcação (HER2 e CEN17) permite observar e avaliar distintamente em simultâneo as marcações conseguidas pelo uso das duas sondas, sendo possível observar a morfologia do tecido^{3; 50}, facto que permite classificar correctamente o estado de amplificação não havendo confusão com os casos que apresentam polissomia do CR17.

Algumas das vantagens da metodologia SISH por dupla marcação HER2/CEN17 relativamente à metodologia FISH são a rapidez do método, a automatização do protocolo, visualização simultânea de HER2/CEN17 no núcleo da mesma célula, obtenção de sinais de marcação do gene HER2 discretos, capacidade de reprodutibilidade na detecção de sinais do gene HER2 e CEN17 nos tecidos do estroma e linfócitos que asseguram um eficaz controlo interno; não há perda da morfologia do tecido, possibilidade de visualização dos sinais no microscópio óptico de campo claro, sem necessidade de utilização de óleo de imersão e a possibilidade de arquivo permanente das lâminas³³.

A automatização diminui a ocorrência de erros por falha humana, aumenta a eficiência e consistência dos métodos,^{3; 50} o que permite aceitar a metodologia SISH como boa alternativa para a FISH neste tipo de avaliação, pois é uma metodologia completamente automática. Após a optimização do método automático SISH, ficam apenas as condicionantes pré-analíticas para a validade dos resultados.

A metodologia SISH já está estandardizada para a plataforma automática que tem mostrado resultados reprodutíveis e de confiança, estando a aguardar aprovação pela FDA^{3; 33; 45}.

A Ventana desenvolveu um sistema de visualização de imagens que produz uma imagem digital do campo observado ao microscópio que permite a contagem automática do número de sinais referentes ao número de cópias do gene HER2 ou CEN17. Quando o número pré-estabelecido de células seleccionado é alcançado, o próprio software calcula o rácio HER2/CEN17³.

No que concerne aos resultados obtidos pelos dois métodos de HIS, o SISH e FISH, é possível constatar uma concordância global de 94,74% entre os dois métodos, sendo a concordância para os casos positivos de 100%, resultado que sugere que o método SISH apresenta uma grande sensibilidade. Esta ideia é reforçada pelo facto de não terem sido considerados casos equívocos pelo SISH, quando pelo FISH foram registados cinco casos equívocos. Quanto ao valor da concordância estimada para a percentagem de casos negativos este foi mais baixo (93,18%). Contudo é de salientar que este valor pode não reflectir a realidade uma vez que a avaliação do FISH pode ter sido realizada numa área tumoral não invasiva, por incapacidade de distinguir a morfologia do tecido poderia ter sido contabilizado núcleos de células não tumorais, onde o gene HER2 não está amplificado.

Estudos recentes (Arnould et al, 2007) mostram uma correlação positiva entre o nível de amplificação do HER2 e a taxa de resposta às terapias com trastuzumab. Esta evidência sugere que o estudo por HIS deve ser feito não só nos casos 2+ mas também nos casos 3+⁴⁴.

Para a obtenção de bons resultados na metodologia SISH deve ser tido em consideração que os tecidos fixados em formol e impregnados em parafina sejam adequados para o estudo. Relativamente à fixação das amostras foi utilizado um tempo de 6 a 48 horas^{10; 27; 29}. O fixador recomendado é o formol neutro tamponado a 10%²⁹, tendo sido o utilizado no presente estudo.

Os cortes histológicos devem ter uma espessura apropriada (aproximadamente 4 µm) e devem ser estendidos em lâmina de vidro Superfrost Plus, de forma a resistirem aos tratamentos a que vão ser sujeitos. Cortes de espessura superior a 4 µm poderão exigir um tratamento com a protease mais intenso e poderá levar a uma maior formação de bolhas nucleares ("Nuclear Bubbling") (Figura 8A), comparativamente aos cortes mais finos, devido ao excesso de parafina no tecido. Este facto pode levar a uma incorrecta interpretação dos resultados, pois o artefacto criado não permite a visualização correcta de todos os sinais de marcação, inviabilizando a sua contagem.

O artefacto de bolhas pode ainda ser devido a uma sub-fixação. A forma de contornar este contratempo é efectuar um tempo de fixação adequado, aumentar o tempo de fixação adequado, aumentar o tempo de recuperação antigénica, e/ou ajustar o tempo de digestão enzimática com a protease, ou ainda efectuar a desparafinação dos cortes de forma mais eficaz antes de todo o processamento na plataforma automática. No entanto, ocasionalmente a formação acentuada de bolhas nucleares poderá alterar os sinais de marcação HIS ou torná-los indiscerníveis de tal forma que a contagem exacta não seja possível.

Os pontos críticos do método SISH são a desparafinação, a recuperação antigénica pelo calor, a digestão enzimática pela protease e a lavagem adstringente, pois estes passos se não forem correcta e cuidadosamente executados poderão invalidar todo o procedimento.

A coloração de contraste quando excessiva ou incompleta pode comprometer a correcta interpretação dos resultados obtidos.

Na observação microscópica apenas devem ser consideradas para classificação as áreas de carcinoma invasivo. O carcinoma *in situ* (ductal ou lobular) em amostras de mama não deve ser avaliado. Se necessário devemos consultar corte histológico com a coloração de HE correspondente para determinar melhor as áreas alvo apropriadas para a contagem na lâmina corada pela metodologia HIS.

6. Conclusão e perspectivas futuras

A Metodologia SISH foi estabelecida com sucesso no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Pedro Hispano. Os casos efectuados desde a sua implementação têm sido realizados simultaneamente por FISH em laboratório externo e os resultados obtidos têm sido 100% concordantes com excepção de um caso em que após várias tentativas não foi possível avaliar por FISH tendo sido dado como não amplificado pela metodologia SISH.

Relativamente à metodologia FISH, a metodologia SISH não necessita de microscópio de fluorescência com múltiplos filtros para analisar os resultados; resulta numa coloração permanente cujas lâminas podem ser arquivadas e consultadas posteriormente; os resultados obtidos não necessitam ser gravados com o recurso de câmara digital; a morfologia dos tecidos da amostra é facilmente analisada; em termos de tempo de execução é uma técnica muito mais rápida e tem ainda a vantagem de ser completamente automatizada^{10; 26; 30; 33}.

Estudos interlaboratoriais recentes evidenciam que o método SISH apresenta uma maior homogeneidade de resultados inter observadores, nomeadamente nos casos tidos como equivocados noutras metodologias^{26; 30}.

A vantagem de visualizar as duas marcações, HER2 e CR17, simultaneamente na mesma lâmina, reduz a necessidade de repetições nos casos dúbios, e diminui o número de resultados falso-positivos, nomeadamente nos casos de alterações do CR17 (polissomias) e casos equívocos de IHQ (2+).

Estão já em curso os primeiros passos para a aplicação da metodologia SISH na avaliação de HER2 em tumores de estômago para abordagem terapêutica semelhante à aplicada nas doentes com carcinoma da mama, com as devidas ressalvas pois a heterogeneidade destes tipos de neoplasia é maior, pelo que se requer maior cuidado e atenção, bem como um maior nº de células a ter em conta para considerar o caso como positivo⁵².

A metodologia SISH tem potencialidades para ser usada para a pesquisa de outros genes,³³ bem como a possibilidade de combinação com outros métodos de coloração para a detecção simultânea de mais genes ou combinação de genes e proteínas³.

A VENTANA anunciou para breve a incubação simultânea das duas sondas, o que vai implicar uma redução substancial na execução do método, mais de 50%, de 14 para 6 horas.

Está em discussão a validade da aplicação na rotina clínica da avaliação de células tumorais circulantes como marcadores de pior prognóstico. A polémica reside num resultado positivo para as células circulantes mesmo que a pesquisa no tumor primitivo seja negativo. Estudos actuais questionam a possibilidade de que algumas destas células tumorais circulantes possam representar células *stem* do carcinoma da mama¹¹.

Os trabalhos desenvolvidos apontam para o aperfeiçoamento dos testes para o estudo do estado do HER2, reforço da pesquisa dos biomarcadores da eficácia e resistência, preditivos de toxicidade à terapêutica dirigida ao HER2, contribuindo para o esforço continuado de alcançar a cura do cancro da mama HER2 positivo.

Referências

1. WHO, (2010). World Cancer Research Fund American Institute for Cancer Research, A Global Perspective, Vol. Cancer, pp. 289:295.
2. IARC, I. A. f. R. o. C. (2010). GLOBOCAN 2008 - Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 (Organization, W. H., ed.), Vol. 2010, Lyon
3. Richard D. Powell, J. D. P., William C. Powell, Patrick C. Roched, Thomas M. Grogand, James F. Hainfelda, Raymond R. Tubbs. (2007). Metallographic in situ hybridization. *Human Pathology* 38, 1145-1159.
4. Dixon, J. (2006). *ABC of breast diseases*. Blackwell Publishing Ltd.
5. Carroll, J. C., Cremin, C., Allanson, J., Blaine, S. M., Dorman, H., Gibbons, C. A., Grimshaw, J., Honeywell, C., Meschino, W. S., Permaul, J. & Wilson, B. J. (2008). Hereditary breast and ovarian cancers. *Can Fam Physician* 54, 1691-1692.
6. Pruthi S, G. B., Lindor NM. (2010). Identification and Management of Women With BRCA Mutations or Hereditary Predisposition for Breast and Ovarian Cancer. *Mayo Clin Proc.* 85, 1111-20.
7. Walsh T, C. S., Coats KH, Swisher E, Stray SM et al. . (2006). Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer. *GBETH Newsletter* 04, 1379-88.
8. Rosai, J. (2004). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 9th edit, 2nd, Elsevier, Edinburgh.
9. Pruthi, S., Brandt, K. R., Degnim, A. C., Goetz, M. P., Perez, E. A., Reynolds, C. A., Schomberg, P. J., Dy, G. K. & Ingle, J. N. (2007). A Multidisciplinary Approach to the Management of Breast Cancer, Part 1: Prevention and Diagnosis. *Mayo Clinic Proceedings* 82, 999-1012.
10. Hanna W, O. m. F., Barnes P, Berendt R, Gaboury L, Magliocco A, Pettigrew N, Robertson S, Sengupta S, Têtu B, Thomson T. (2007). Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. *Curr Oncol.* 14, 149-53.
11. Ross, J. S., Slodkowska, E. A., Symmans, W. F., Puztai, L., Ravdin, P. M. & Hortobagyi, G. N. (2009). The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist* 14, 320-368.
12. Hicks, D. G., Kulkarni, S. (2008). HER2+ Breast Cancer: Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *American Journal of Clinical Pathology* 129, 263-273.
13. Cotran, K., Robbins. (1989). *Pathologic Basis of Disease*. 4th edit, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
14. AJCC. (2010). *Cancer Staging Handbook*. Seventh edit, Springer.
15. WHO, W. H. O. (1982). The World Health Organization Histologic Typing of Breast Tumors. *Am. J. Clin. Pathol* 78, 806.
16. Cianfrocca M, G. W. (2009). New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin* 59, 303-13.
17. Geyer FC, M. C., Reis-Filho JS. (2009). The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology* 41, 77-88.
18. B. Pestalozzi, M. C., and On behalf of the ESMO Guidelines Working Group. (2008). Primary breast cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19, ii7-ii10
19. A. Goldhirsch, J. N. I., R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann, H.-J. Senn & Panel members. (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early *Annals of Oncology* 20, 1319-1329.
20. Murphy Conleth G, S. M. (2009). HER2 breast cancer therapies: a review. *Biologics: Targets & Therapy* 3, 289-301.
21. A Scorilas, T. T., J Yotis, C Pateras and M Talieri. (1999). Determination of c-myc amplification and overexpression in breast cancer patients: evaluation of its prognostic value against c-erbB-2, cathepsin-D and clinicopathological characteristics using univariate and multivariate analysis. *British Journal of Cancer* 81 1385-1391.
22. Schechter AL, S. D., Vaidyanathan L et al. . (1984). The neu oncogene: An erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 513-516.

23. Vogel CL, C. M., Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1, 719-26.
24. Roche Farmacêutica Química, L. (2010). Cancro da Mama HER2+: O que é o HER2?, Vol. 2010. Roche Farmacêutica Química, L.
25. Arnould, L., Denoux, Y., MacGrogan, G., Penault-Llorca, F., Fiche, M., Treilleux, I., Mathieu, M. C., Vincent-Salomon, A., Vilain, M. O. & Couturier, J. (2003). Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *British Journal of Cancer* 88, 1587-1591.
26. van de Vijver, M., Bilous, M., Hanna, W., Hofmann, M., Kristel, P., Penault-Llorca, F. & Rüschhoff, J. (2007). Chromogenic in situ hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study. *Breast Cancer Research* 9, R68.
27. Gown, A. M. (2008). Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 21 Suppl 2, S8-S15.
28. Piccart-Gebhart MJ, P. M., Leyland-Jones B, et al. . (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 1659-72.
29. Wolff A, H. M., Schwartz J, et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25, 118-45.
30. Pothos, A., Plastira, K., Plastiras, A., Vlachodimitropoulos, D., Goutas, N. & Angelopoulou, R. (2008). Comparison of Chromogenic In Situ Hybridisation with Fluorescence In Situ Hybridisation and Immunohistochemistry for the Assessment of Her-2/neu Oncogene in Archival Material of Breast Carcinoma. *Acta Histochemica Et Cytochemica* 41, 59-64.
31. Bartlett, J. M. S., Campbell, F. M., Ibrahim, M., Wencyk, P., Ellis, I., Kay, E., Connolly, Y., O'Grady, A., Di Palma, S., Starczynski, J., Morgan, J. M., Jasani, B. & Miller, K. (2009). Chromogenic In Situ Hybridization: A Multicenter Study Comparing Silver In Situ Hybridization With FISH. *American Journal of Clinical Pathology* 132, 514-520.
32. Bartlett, J. M. S., Campbell, F. M. & Mallon, E. A. (2008). Determination of HER2 Amplification by In Situ Hybridization: When Should Chromosome 17 Also Be Determined? *American Journal of Clinical Pathology* 130, 920-926.
33. Nitta, H., Hauss-Wegrzyniak, B., Lehrkamp, M., Murillo, A. E., Gaire, F., Farrell, M., Walk, E., Penault-Llorca, F., Kurosumi, M., Dietel, M., Wang, L., Loftus, M., Pettay, J., Tubbs, R. R. & Grogan, T. M. (2008). Development of automated brightfield double In Situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence In Situ hybridization (FISH). *Diagnostic Pathology* 3, 41.
34. Watters, A. D., Ed. (2005). ISH - Medical Biomethods Handbook. Hatfield, UK.
35. Thaer Khoury, S. S., Helena Hwang, Rameela Chandrasekhar, Gregory Wilding, Dongfeng Tan and Swati Kulkarni. (2009). Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Modern Pathology* 22, 1457-1467.
36. García-Caballero T, G. D., Green AR, Gregory J, Schad A, Kohlwes E, Ellis IO, Watts S, Mollerup J (2010). Determination of HER2 amplification in primary breast cancer using dual-colour chromogenic in situ hybridization is comparable to fluorescence in situ hybridization: a European multicentre study involving 168 specimens. *Histopathology* 56.
37. Tubbs R, P. J., Skacel M, Powell R, Stoler M, Roche P, et al. (2002). Gold-facilitated in situ hybridization: a bright-field autometallographic alternative to fluorescence in situ hybridization for detection of Her-2/neu gene amplification. *Am J Pathol.* 160, 1589-95.
38. Gallegos Ruiz MI, F. K., Vos W, Grünberg K, Meijer GA, Rodriguez JA, Giaccone G. . (2007). Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number detection in non-small-cell lung cancer; a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization. *Histopathology* 51, 631-7.

39. Tanner M, G. D., Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart M, Jolsa J. (2000). Chromogenic in situ hybridization: A practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 157, 1467-1472.
40. Giovanni Pauletti, S. D., HongMei Rong, Lillian Ramos, HongJun Peng, Ram Seshadri, and Dennis J. Slamon. (2000). Assessment of Methods for Tissue-Based Detection of the HER-2/neu Alteration in Human Breast Cancer: A Direct Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. *J Clin Oncol*; 18, 3651-3664.
41. Hanna, W. M. & Kwok, K. (2006). Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Modern Pathology* 19, 481-487.
42. Todorović-Raković N, J. D., Nesković-Konstantinović Z, Nikolić-Vukosavljević D. (2007). Prognostic value of HER2 gene amplification detected by chromogenic in situ hybridization (CISH) in metastatic breast cancer. *Exp Mol Pathol* 82 262-268.
43. Di Palma, S., Collins, N., Faulkes, C., Ping, B., Ferns, G., Haagsma, B., Layer, G., Kissin, M. W. & Cook, M. G. (2006). Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 60, 1067-1068.
44. Shousha S, P. D., Amo-Takyi B, Morgan M, Jasani B. (2009). Evaluation of automated silver-enhanced in situ hybridization (SISH) for detection of HER2 gene amplification in breast carcinoma excision and core biopsy specimens. *Histopathology* 54, 248-53
45. Dietel, M., Ellis, I. O., Höfler, H., Kreipe, H., Moch, H., Dankof, A., Kölbl, K. & Kristiansen, G. (2007). Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Archiv* 451, 19-25.
46. VENTANA. (2008). INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail. *Manual de instruções do kit* 800-4422.
47. Slamon DJ, R. E., Perez EA; . (2006). Advances in adjuvant therapy for breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 4, 4-9.
48. Arnould, L., Denoux, Y., MacGrogan, G., Penault-Llorca, F., Fiche, M., Treilleux, I., Mathieu, M. C., Vincent-Salomon, A., Vilain, M. O. & Couturier, J. (2003). Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer* 88, 1587-91.
49. Rhodes A, J. B., Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. (2000). Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol.* 53, 125-30.
50. Chibon F, d. M. I., Sierankowski G, Brouste V, Bonnefoi H, Debled M, Mauriac & L, M. G. (2009). Prediction of HER2 gene status in Her2 2+ invasive breast cancer: a study of 108 cases comparing ASCO/CAP and FDA recommendations. *Mod Pathol.* 22, 403-9.
51. Khoury, T., Sait, S., Hwang, H., Chandrasekhar, R., Wilding, G., Tan, D. & Kulkarni, S. (2009). Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Modern Pathology* 22, 1457-1467.
52. Hofmann M, S. O., Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. (2008). Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer results from a validation study. *Histopathology* 52, 797-805.

Anexos

Anexo 1. Visualização esquemática da interpretação dos sinais de marcação de SISH



	Não contar se os núcleos estiverem sobrepostos.		Os agrupamentos SISH pequenos apenas podem ser estimados utilizando o tamanho de um ponto único como referência; utilizar células estromais para estimar o tamanho do sinal (célula mais pequena à direita). Por exemplo, este agrupamento pode ser estimado como apresentando 6 sinais SISH - adicionando os outros 2 sinais únicos, resulta numa contagem total de 8. Contar como 2 sinais vermelhos. Anotar na folha de pontuação que estão presentes agrupamentos para HER2.
	Não contar se não estiver presente nenhum sinal.		Estimar o agrupamento maior. Aqui, o agrupamento pode ser estimado como apresentando 12 sinais pretos - adicionando os outros 4 sinais únicos, resulta numa contagem total de 16. Contar os sinais vermelhos como 2 cópias de Cromossoma 17. Anotar na folha de pontuação que estão presentes agrupamentos para HER2.
	Não contar se só estiver presente um sinal de uma cor.		Um sinal vermelho próximo de um sinal preto deverá ser contabilizado como um sinal vermelho e um sinal preto. Isto poderá exigir a enumeração com uma objectiva de 60X para distinguir. Por isso, contar como 4 sinais pretos e 2 sinais vermelhos. Se não for possível distinguir os sinais sobrepostos, não contar esses núcleos.
	Não contar se os sinais estiverem fora dos núcleos.		Agrupamento de pontos pretos obscurecendo o(s) sinal(s) vermelho(s). É possível utilizar uma amplificação superior (60X) numa tentativa de confirmar a presença ou ausência de sinal(s) vermelho(s); caso contrário, não contar: contar sempre núcleos com sinais vermelhos claros. Anotar a presença de agrupamentos SISH na folha de pontuação. Os núcleos com números visíveis e superiores de sinais vermelhos devem ser pontuados em núcleos com agrupamentos SISH.
	Contar como 1 sinal preto (HER2) e 1 vermelho (Chr17).		Se ocorrer "poeira" de fundo SISH nos núcleos, contar apenas se os sinais SISH específicos forem claramente distinguíveis do fundo.
	Contar como 2 sinais pretos (HER2) e 2 vermelhos (Chr17).		Poderá observar-se uma bruma vermelha e não deve ser confundida com um sinal. O sinal vermelho poderá variar em termos de intensidade, mas é sempre discreto. A imagem apresenta 2 sinais vermelhos discretos (Chr17) e 2 pretos (HER2).
	Contar como 1 sinal preto (HER2) e 2 vermelhos (Chr17). O sinal preto é um "dípolo". Contar dois sinais adjacentes da mesma cor apenas se a distância entre os sinais for igual ou superior ao diâmetro de um único sinal.		

Retirado do folheto de instruções de **INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, ref. 8004422, Ventana**
1008041PT Rev B

Anexo 2. Folha de registo da contagem de sinais de marcação para avaliação do estado de amplificação

Method #1

HER2: Estimated average number of <i>HER2</i> Signals in Target Area 1	a
Chr17: Estimated average number of Chr17 Signals in Target Area 1	b
HER2/Chr17 Ratio	c = a/b
<input type="checkbox"/> Negative: <i>HER2</i> /Chr17 < 1.4	
<input type="checkbox"/> Positive: <i>HER2</i> /Chr17 > 4.0	
<input type="checkbox"/> 1.4 ≤ <i>HER2</i>/Chr17 ≤ 4.0 Use Method #2	

Interpretation of Results – Score Sheet for Method 2 and Method 2A

Method #2

Target Area 1

Cell	HER2 Count	Cell	Chr17 Count
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
5		5	
6		6	
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	
11		11	
12		12	
13		13	
14		14	
15		15	
16		16	
17		17	
18		18	
19		19	
20		20	
Total number of HER2 signals in Target Area 1		Total number of Chr17 signals in Target Area 1	
d		e	
Target Area 1 HER2/Chr17 Ratio			
f = d/e			
<input type="checkbox"/> Negative: HER2/Chr17 < 1.8			
<input type="checkbox"/> Positive: HER2/Chr17 > 2.2			
<input type="checkbox"/> 1.8 ≤ HER2/Chr17 ≤ 2.2 Use Method #2A			

Target Area 2

Cell	HER2 Count	Cell	Chr17 Count
1		1	
2		2	
3		3	
4		4	
5		5	
6		6	
7		7	
8		8	
9		9	
10		10	
11		11	
12		12	
13		13	
14		14	
15		15	
16		16	
17		17	
18		18	
19		19	
20		20	
Total number of HER2 signals in Target Area 2		Total number of Chr17 signals in Target Area 2	
g		h	
Target Areas 1 and 2 HER2/Chr17 Ratio:			
$k = (d+g)/(e+h)$			
<input type="checkbox"/> Negative: $HER2/Chr17 < 1.8$			
<input type="checkbox"/> Positive: $HER2/Chr17 > 2.2$			
<input type="checkbox"/> Equivocal: $1.8 \leq HER2/Chr17 \leq 2.2$			